

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Medicina Dentária



# **Tumorigénese das Glândulas Salivares**

Rita Margarida Cardoso Monteiro

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2014

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Medicina Dentária



# **Tumorigénese das Glândulas Salivares**

Rita Margarida Cardoso Monteiro

Dissertação Orientada

Pelo Professor Doutor Daniel de Sousa

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2014

*“Muitos são os obstinados que se empenham no caminho que escolheram, poucos os que se empenham no objetivo” – Friedrich Nietzsche*

## **Agradecimentos**

Um especial agradecimento ao Professor Doutor Daniel de Sousa pela exaustiva orientação e por primar sempre pela excelência deste trabalho

Aos meus pais e avós por me terem guiado, apoiado e possibilitado este caminho

À minha irmã, pelo modelo a seguir

À minha “família” de faculdade, pelos bons momentos neste duro percurso

A ti, pelo incondicional apoio.

## Resumo

Os tumores das glândulas salivares constituem um complexo e raro grupo, dentro das neoplasias da cabeça e pescoço. Este facto torna a sua identificação e classificação difícil, e muitas vezes, tardia.

Este trabalho tem como principal objetivo obter uma revisão da literatura acerca dos tumores das glândulas salivares, nomeadamente sobre a sua etiopatogénese, quais os fatores genéticos envolvidos e qual o seu papel na tumorigénese salivar.

Alguns fatores etiológicos foram identificados como possíveis indutores de tais tumores, destacando-se entre estes os vírus, existência de hábitos tabágicos/etanólicos, hormonas e ambiente.

Quanto à origem celular, duas teorias foram propostas para a explicar, sendo a teoria bicelular a mais aceite atualmente como a correta, esclarecendo a função das células estaminais cancerígenas como precursoras destes tumores.

Fatores genéticos específicos foram identificados nos principais tumores estudados – adenoma pleomórfico, carcinoma adenoide cístico, carcinoma Mucoepidermóide e tumor de Warthin – e que possuem uma relevância na iniciação, progressão e prognóstico tumoral, observando-se assim que a tumorigénese das glândulas salivares não é aleatória. Este facto poderá revelar-se útil na deteção precoce e com maior exatidão de qual a neoplasia em causa, possibilitando um tratamento mais adequado, mais prematuro e menos invasivo.

Porém, conclui-se que apesar dos últimos avanços científicos na área genética da tumorigénese salivar, são necessários mais estudos que permitam entender a verdadeira importância das modificações genéticas encontradas, e como usar este conhecimento em prol da prevenção da doença.

**Palavras-chave:** tumores; glândulas salivares; tumorigénese; etiopatogenia; fatores genéticos.

## **Abstract**

Tumors of the salivary glands form a complex and rare group of neoplasms in the area of head and neck. This makes their identification and classification difficult and often late.

This paper aims to obtain a review of the literature on tumors of the salivary glands, particularly on its etiopathogenesis, which genetic factors are involved and what is their role on salivary tumorigenesis.

Some etiological factors have been identified as potential inducers of such tumors, mainly the viruses, smoking / ethanol habits, hormones and environment.

Regarding the cellular origin, two theories have been proposed to explain it, being the bicellular theory the most currently accepted as the correct theory, clarifying the role of cancer stem cells as precursors of these tumors.

Specific genetic factors have been identified in the main tumors studied - pleomorphic adenoma, adenoid cystic carcinoma, mucoepidermoid carcinoma and Warthin's tumor - which have a relevance in the initiation, progression and tumor prognosis, noting the tumorigenesis of salivary glands is not random . This may prove useful in early detection and more accuracy finding which neoplasm is in question, enabling a better, more premature and less invasive treatment.

However, it is concluded that despite the latest scientific advances in the area of genetic salivary tumorigenesis, more studies are needed to understand the true importance of the genetic changes identified, and how to use this knowledge for disease prevention.

**Key-Words:** tumors; salivary glands; tumorigenesis; etiopathogenesis; genetic factors.

# Índice

<b>Agradecimentos</b>	<i>i</i>
<b>Resumo</b>	<i>ii</i>
<b>Abstract</b>	<i>iii</i>
<b>Índice de Anexos</b>	<i>vi</i>
<b>Abreviaturas e acrónimos</b>	<i>vii</i>
<b>Introdução</b>	1
<b>1.1. Embriogénese das Glândulas Salivares</b>	1
<b>1.2. Anatomofisiologia</b>	1
<b>1.2.1. Glândula Parótida</b>	2
<b>1.2.2. Glândulas Submandibular e Sublingual</b>	2
<b>1.2.3. Glândulas Salivares <i>minor</i></b>	2
<b>2. Objetivos</b>	3
<b>3. Materiais e Métodos</b>	3
<b>4. Resultados</b>	3
<b>4.1. Epidemiologia</b>	3
<b>4.2. Etiologia</b>	4
<b>4.2.1. Vírus</b>	4
<b>4.2.2. Hábitos Tabágicos e Etanólicos.</b>	5
<b>4.2.3. Radiação</b>	6
<b>4.2.4. Hormonas</b>	7
<b>4.2.5. Ambiente e Exposição Ocupacional</b>	7
<b>4.3. Origem celular dos tumores das glândulas salivares</b>	8
<b>4.3.1. Teoria multicelular ou multiclonal</b>	8
<b>4.3.2. Teoria bicelular ou monoclonal</b>	8
<b>4.3.2.1. Células estaminais cancerígenas</b>	9
<b>4.4. Alterações Genéticas Específicas nos Tumores das Glândulas Salivares</b>	11
<b>4.4.1. Adenoma Pleomórfico</b>	11
<b>4.4.2. Carcinoma Adenóide Cístico</b>	16
<b>4.4.3. Carcinoma Mucoepidermóide</b>	21

<b>4.4.4. Tumor de Warthin</b>	24
<b>4.5. Alterações Inespecíficas nos Tumores das Glândulas Salivares</b>	25
<b>4.5.1. P63</b>	25
<b>5. Discussão de Resultados</b>	26
<b>6. Conclusões</b>	29
<b>Referências Bibliográficas</b>	i
<b>Anexos</b>	xiii



## **Índice de Anexos**

Anexo 1 – Estruturas Salivares	xiii
Anexo 2 – Classificação histológica dos TGS pela OMS	xiv
Anexo 3 – Vias de formação de células estaminais cancerígenas	xv
Anexo 4 – Ilustração esquemática de genes envolvidos no AP	xvi
Anexo 5 – Via de regulação do gene CLYD e a sua imunoreatividade	xvii
Anexo 6 – Representação esquemático da TP63 e a sua expressão	xviii

## Abreviaturas e acrónimos

AC - Adenóide Cístico

ALDH - *Aldehyde dehydrogenases*

AP – Adenoma Pleiomórfico

APC – *Adenomatous polyposis coli*

BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*

cAMP – *3'-5'-cyclic adenosine monophosphate*

CEC – Células estaminais cancerígenas

C-Kit – *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*

CHCHD7 - *Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7*

CLYD – *Cylindromatosis*

CMVh – Citomegalovírus humano

CREB – *cAMP response element-binding protein*

CREBBP – *CREB Binding Protein*

CTRC – *Chymotrypsin C*

CTNNB1 - *Catenin (cadherin - associated protein), beta 1*

DEFA –  $\alpha$ - defensina humana

EBV – Vírus Epstein-Barr

EGF – *Epidermal growth factor*

EGFR - *Epidermal growth factor receptor*

ErbB1/2 – *Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene*

ERK1/2 – *Extracellular signal-regulated kinases*

FBLN1 – *Fibulin-1*

FGF – *Fibroblast growth factor*

FGFR – *Fibroblast growth factor receptor*

FHIT – *Fragile histidine triad*

GS – Glândula(s) Salivar(es)

FMDUL - Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa

HES1/2 – *Hairy and enhancer of split homolog-1/2*

HH8 – Herpes Vírus 8

HMAG2 – *High mobility group AT-Hook2*

HPV - Vírus Papiloma Humano

IL-6 – Interleucina-6

IkB – *Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor*

IKK – *Cinase Complex IkB*

KDM6A – *Lysine (K)-specific demethylase 6A*

LIFR - *Leukemia inhibitory factor receptor alfa*

MAML2 – *Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog*

MDM2 – *Murine double minute 2*

MYB – *Avian Myeloblastosis Viral Oncogene*

ME – *Mucoepidermóide*

NFIB – *Nuclear factor I/B*

NF-kB – *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NGF – *Nerve growth factor*

PCR – *Polymerase chain reaction*

PDGFB – *Platelet-derived growth factor subunit B*

PLAG1 - *Pleiomorphic Adenoma Gene 1*

TCEA – *Transcription elongation factor A*

TGS – *Tumor(es) da(s) glândula(s) salivar(es)*

TNM – *Tumor; Nódulos; Metástases*

TW – *Tumor de Warthin*

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR – *Vascular endothelial growth factor receptor*

WIF1 – *WNT inhibitory factor 1*

# **1. Introdução**

O estudo dos tumores das glândulas salivares (TGS) envolve muitas questões e algumas controvérsias, o que o torna especialmente complexo.

Os critérios de diagnóstico mostram-se incompletos, os subtipos de tumores são numerosos e podem coexistir diferentes tipos histológicos em diferentes áreas dentro do mesmo tumor e em diferentes tumores do mesmo subtipo. Estes fatores, coadjuvados com a raridade dos TGS, contribuem para que os problemas do seu diagnóstico e prognóstico sejam frequentes e inevitáveis.

É por isso oportuno proceder a uma revisão sobre o estado atual do conhecimento da morfogenética, histopatogénese e tumorigénese dos TGS.

## **1.1. Embriogénese das Glândulas Salivares**

As glândulas salivares (GS) iniciam o seu desenvolvimento entre as 6 a 9 semanas de gestação. As glândulas major derivam da ectoderme, enquanto as minor podem surgir tanto da ecto como da endoderme, dependendo da sua localização. O desenvolvimento de cada glândula salivar inicia-se com a invaginação de tecido do epitélio oral, formando pequenos aglomerados celulares. A posterior diferenciação permite a formação de túbulos constituídos por duas camadas de células epiteliais que por sua vez se diferenciam em ductos, ácinos e células mioepiteliais. A primeira das glândulas a surgir, durante a sexta semana de gestação, é a glândula parótida primordial, que se desenvolve a partir do estomódio posterior. Uma cápsula formada a partir do mesênquima rodeia a glândula e os nódulos linfáticos associados (Moore *et al.*, 2012).

## **1.2. Anatomofisiologia**

As GS são órgãos exócrinos, responsáveis pela produção e secreção de saliva através de estruturas denominadas ductos, sendo o seu controlo feito através do sistema nervoso autónomo. Podem ser classificadas como glândulas major – glândula parótida (localizada entre o ramo mandibular e o ouvido), glândula submandibular (localizada na região posterior do pavimento bucal, inferior ao músculo milohióideo) e glândula submaxilar (localizada na região anterior do pavimento bucal, superior ao músculo milohióideo) – ou glândulas minor (600 a 1000 glândulas) e com uma

distribuição inespecífica ao longo da cavidade oral (Hollins, 2012) (ver anexo 1). Uma cápsula de tecido conjuntivo rico em fibras de colagénio reveste as GS major. O seu parênquima consiste em terminações secretoras – ácinos - e num sistema de ductos, que se unem formando lóbulos. Os ácinos podem ser constituídos por dois tipos de células – serosas ou mucosas – para além das células mioepiteliais não secretoras. As células serosas possuem geralmente um formato piramidal, produzindo essencialmente componente proteico. As células mucosas possuem um formato cubóide ou colunar produzindo essencialmente glicoproteínas (nomeadamente mucina). Os ácinos continuam-se pelas células dos ducto intercalado, a que se seguem as do ducto estriado, que por fim se unem no ducto excretor, sendo este revestido por um epitélio pseudoestratificado colunar (Junqueira & Carneiro, 2004; Guyton & Hall, 2006). A excreção diária de saliva é de 800 a 1500 ml, com um valor médio de 1000ml. Esta possui um pH compreendido entre os valores de 6,0 e 7,0. Possui funções como a lubrificação, humidificação da cavidade oral, secreção de enzimas digestivas (como a amilase) e produção de agentes antimicrobianos (nomeadamente IgA, Lisozima e lactoferrina) (Guyton & Hall, 2006).

#### **1.2.1. Glândula parótida**

A glândula parótida é sobretudo serosa e o seu parênquima dividido em lóbulos, separados por septos fibrosos. Contém grânulos de secreção ricos em proteínas e elevada atividade de amilase (Hollins, 2012).

#### **1.2.2. Glândulas submandibular e sublingual**

A glândula submandibular é uma glândula mista (serosa e mucosa), com predominância do componente seroso (~90%). Os ductos intercalados são mais curtos e os estriados mais conspícuos relativamente à glândula parótida. A glândula sublingual é também uma glândula mista, sendo o componente mucoso o predominante (Hollins, 2012).

#### **1.2.3. Glândulas Salivares *minor***

As GS *minor* possuem uma distribuição dispersa pela cavidade oral, sendo mais frequentes na união palato duro/mole, lábios e mucosa oral (mistas). As glândulas *minor* relacionadas com as papilas circunvaladas são denominadas glândulas de von Ebner e consideradas serosas (Hollins, 2012).

## 2. Objetivos

- 2.1. Demonstrar a relevância clínica da identificação histológica, morfogenética e etiológica dos tumores das glândulas salivares no âmbito da Medicina Dentária;
- 2.2. Avaliar o estado atual dos conhecimentos acerca da etiologia dos tumores das glândulas salivares;
- 2.3. Esclarecer o papel dos fatores genéticos na indução dos tumores das glândulas salivares e na sua progressão;
- 2.4. Avaliar o papel dos fatores genéticos como linha de investigação futura no diagnóstico e tratamento dos tumores das glândulas salivares.

## 3. Materiais e Métodos

Foi efetuada uma pesquisa nas bases de dados PubMed/Medline e Cochrane com as palavras-chave “Tumorigenesis AND Salivary Gland AND tumors”, em artigos de Literatura de Língua inglesa e portuguesa entre Dezembro de 2013 e Dezembro de 1990. Foram avaliados os resumos dos artigos obtidos e selecionados os artigos de relevância para o tema. Foram ainda consultados como fonte de informação livros existentes na biblioteca da FMDUL, sobre a embriologia, anatomofisiologia e histologia das glândulas salivares.

## 4. Resultados

### 4.1. Epidemiologia

Os dados epidemiológicos acerca dos TGS são escassos e mostram-se muitas vezes incompletos, usualmente focados apenas num subtipo tumoral, em parte pela sua raridade no panorama geral da doença oncológica. Os TGS representam apenas 3-10% de todos os tumores da cabeça e pescoço, com uma taxa estimada de incidência global de 0,4 a 13,5 casos por 100,000 anualmente, valores que variam consoante a população em estudo (Ito *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2010). Os tumores das GS *minor* representam 25% dos TGS (Jones *et al.*, 2008) Num estudo retrospectivo realizado nos EUA entre 1992-2006, a incidência de TGS *major* era de 11.95/1 000 000 /ano, com um total de 6 391 tumores diagnosticados. Aproximadamente 85% dos casos foram incluídos na classificação OMS 2005 (ver anexo 2). O sexo masculino apresenta uma maior incidência que o feminino. O carcinoma mucoepidermóide (ME) ocorreu com maior frequência entre os homens enquanto o carcinoma ME, carcinoma de células acinares e carcinoma adenóide cístico (AC) foram os mais comuns na

população feminina, com uma média de idade de 50 anos. Exceto para os carcinomas AC e ME, que ocorrem igualmente entre todas as raças, os outros subtipos demonstraram valores expressivamente menores em melanodérmicos, comparativamente a leucodérmicos (Boukheris *et al.*, 2009).

Quanto a dados relativos a populações europeias, num estudo retrospectivo realizado no Reino Unido entre 1974-2005, a incidência de TGS era de 1,3%, num total de 58,880 amostras analisadas, com um ratio sexo masculino/feminino de 0,7/1. Dentro das amostras de TGS, 64,9% mostraram ser benignos, com um valor de 35,1% para os tumores malignos. O adenoma pleomórfico (AP) e o carcinoma ME mostraram ser os tumores mais comuns. As GS *major* revelaram menor incidência de casos que as *minor* (38,2% vs.61,8%). A glândula major mais afetada foi a glândula parótida (Jones *et al.*, 2008).

Um estudo retrospectivo (1985-2007) realizado numa população asiática apontou resultados semelhantes, com maior incidência de tumores benignos comparativamente aos malignos (68%vs.32%), sendo o AP o tumor benigno mais comum seguido do tumor de Warthin. Os carcinomas ME e AC foram os tumores malignos mais frequentes. Anota-se uma ligeira diferença em relação aos restantes estudos, com uma maior percentagem de GS *minor* afetadas, e com uma maior incidência no sexo masculino (Tian, 2010).

Relativamente à população portuguesa, um estudo descritivo realizado no IPO Porto entre 1992-2002, que inclui apenas tumores malignos, a distribuição quanto ao género mostrou-se equitativa (55,1% vs. 44,9% no sexo masculino e feminino respetivamente). O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma AC, seguido do carcinoma ME. As GS *major* mostraram uma maior incidência de tumores malignos, em comparação com as GS *minor* (Monteiro *et al.*, 2012). Estes dados vão de encontro aos restantes estudos descritos.

## **4.2. Etiologia**

### **4.2.1. Vírus**

Alguns vírus têm sido assinalados como possíveis indutores tumorais, com um papel relevante na tumorigénese das GS. O citomegalovírus humano (CMVh) tem sido identificado como o elemento primário, dentro da etiologia multifatorial que leva à indução de carcinoma ME. A expressão de proteínas ativas pelo CMVh está correlacionada com mais de 90% dos carcinomas ME das

GS, estando ainda associada com a regulação positiva e ativação de vias oncogénicas conhecidas, como é o caso das vias COX, AREG, EGFR e ERK. Os marcadores para a atividade do CMVh estão ausentes nos tecidos das GS não-neoplásicas. (Melnick *et al.*, 2012; Melnick *et al.*, 2013).

É ainda inconclusivo o papel do vírus Epstein-Barr (EBV) na tumorigénese das GS. Em alguns estudos, este tem sido relacionado com os carcinomas linfoepiteliais das GS através de uma alteração do gene LMP1, que é responsável pela ativação de várias vias de produção de fatores de transcrição, sobretudo em populações asiáticas (Jen *et al.*, 2003). No entanto, nem este nem o CMVh parecem estar envolvidos na tumorigénese de tumores AP ou no tumor de Warthin, e encontram-se ausentes em células salivares normais (Laane *et al.*, 2002).

Estudos indicam que nem o Vírus Papiloma Humano (HPV) nem o Herpes Vírus 8 (HH8) estão envolvidos na etiopatogénese dos TGS (Atula *et al.*, 1998; Klusmann *et al.*, 2000).

O vírus Símio 40 (SV40) é um vírus que contém ADN altamente oncogénico com capacidade de indução de tumores e que tem vindo a ser recentemente associado a diferentes tumores humanos. Acredita-se que este apenas se transmite sob circunstâncias excecionais de macacos para humanos; no entanto é conhecida a contaminação de algumas vacinas anti-poliomielite entre os anos de 1955-1963 por este vírus, e que foram administradas em humanos por todo o mundo. Sequências específicas de SV40 foram detetadas por técnicas de PCR em amostras humanas de tumores AP. Foi observada a ausência total do vírus em tecidos salivares saudáveis (Martinelli *et al.*, 2002)

#### **4.2.2. Hábitos Tabágicos e Etanólicos.**

Os hábitos tabágicos e etanólicos são identificados como fortes fatores carcinogénicos, envolvidos na etiopatogénese de muitos tumores. No entanto, numa monografia elaborada pela International Agency for Research on Cancer (IARC) sobre fumadores, o tabaco não pôde ser classificado como carcinogénico para TGS pelos escassos e inadequados dados atuais sobre o assunto (IARC, 2004)

Apesar dessa constatação, vários estudos têm demonstrado uma possível associação causal entre hábitos tabágicos e TGS, mais especificamente no tumor



de Warthin (Voires & Ramirez, 1997; Klusmann *et al.*, 2006; Sadetzki *et al.*, 2008). O risco é maior quanto mais precoce for a idade de início do hábito. Foi observada uma tendência de aumento de risco com a intensidade (nº de cigarros/dia, nº maços/ano) e duração do hábito. Existe uma diminuição do risco, de forma não linear, com o aumento do tempo desde a cessação tabágica (Klusmann *et al.*, 2006; Freedman *et al.*, 2009). Apesar de um estudo indicar que esta associação é mais evidente no género masculino, especialmente quando associada a hábitos etanólicos (Horn-Ross *et al.*, 1997), outros demonstraram não existirem diferenças estatisticamente significativas entre o género feminino e masculino (Voires&Ramirez, 1997; Sadetzki *et al.*, 2008).

Em contraste, nenhuma associação foi observada entre hábitos tabágicos e o desenvolvimento de tumores AP. Para tumores malignos das GS parece existir uma possível associação, especialmente nas categorias de elevada exposição, com carecimento de confirmação futura desta relação (Sadetzki *et al.*, 2008).

#### **4.2.3. Radiação**

Os tumores benignos e malignos das GS têm sido associados com a exposição à radiação ionizante com origem em várias fontes, incluindo a radiação originada pelas bombas atómicas de Nagasaki e Hiroshima. Foi reportada uma incidência elevada de TGS entre o período de 1957-1970, em sobreviventes expostos a doses elevadas de radiação (3 ou mais Grays) e que se localizavam a mais de 5 km do epicentro, sugerindo um forte papel na tumorigénese das GS pela radiação ionizante, particularmente na indução de carcinomas ME e tumor de Warthin. O risco está diretamente relacionado com o nível de exposição de radiação ionizante (Saku *et al.*, 1997).

Também a radiação terapêutica usada no tratamento de tumores na área da cabeça e pescoço mostra um aumento do risco de desenvolvimento de TGS (Horn-Ross *et al.*, 1997; Modan *et al.*, 1997; Boukheris *et al.* 2008). Pacientes com linfoma de Hodgkin sujeitos a radioterapia inicial mostraram uma maior incidência de TGS do que os pacientes apenas sujeitos a quimioterapia. O risco é maior no género feminino e foi mais acentuado entre os pacientes que desenvolveram carcinomas ME, sendo que os pacientes mais novos mostraram maior probabilidade de desenvolvimento de TGS. Os riscos mostra-se maior para

os doentes irradiados antes de 1992, quando as doses aplicadas no tratamento de tumores de cabeça e pescoço eram bastante altas (Boukheris *et al.*, 2008).

Não existe evidência de correlação entre exposição quotidiana aos raios UV e indução de TGS (Sun *et al.*, 1999), porém o risco surge quando a mesma radiação é usada no tratamento de tumores na área da cabeça e pescoço, sem diferenças quanto ao subtipo histológico (Horn-Ross *et al.*, 1997).

#### **4.2.4. Hormonas**

A presença de recetores de hormonas sexuais em alguns tumores sugere que estes possam ter um papel na sua etiopatogénese. Os estudos efetuados sobre o assunto, em TGS, têm obtido conclusões ambíguas. Alguns estudos referem que uma percentagem de tumores malignos e benignos das GS expressam recetores de superfície para estrogénio e progesterona, sugerindo que estes podem ter uma função importante no crescimento tumoral (Jeannon *et al.*, 1999; Ozono *et al.*, 1992), porém os mesmos recetores mostraram fraca correlação com os TGS em vários outros estudos (Dori *et al.*, 2000; Nasser *et al.*, 2003; Barrera *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2009).

Os recetores para o androgénio estão presentes em mais de 90% dos carcinomas do ducto salivar (Fan *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001; Nasser *et al.*, 2003), encontrando-se ainda presentes, embora com menor incidência, nos carcinomas AC e ME (Nasser *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2009). Todavia, pelos diferentes critérios de estudo usados e pelas discrepâncias encontradas, não é ainda possível estabelecer uma correlação exata entre tumorigénese das GS e hormonas sexuais.

#### **4.2.5. Ambiente e Exposição Ocupacional**

Foi identificado que trabalhadores de indústrias da borracha e automóvel, que sofrem exposição ocupacional a materiais como o níquel ou materiais radioativos, ou com empregos em institutos de beleza e cabeleireiros, possuem um risco acrescido de desenvolver TGS (Horn-Ross *et al.*, 1997; Swason & Burns, 1997). Níveis elevados de colesterol podem também estar relacionados com um risco aumentado para TGS, com necessidade de confirmação futura (Horn-Ross *et al.*, 1997; Actis & Eynard, 2000).

### **4.3. Origem celular dos tumores das glândulas salivares**

Duas diferentes hipóteses foram propostas para explicar a origem celular de tumores que contêm componentes morfológicamente distintos:

#### **4.3.1. Teoria multicelular ou multiclonal**

Esta teoria propõe que duas ou mais células estaminais de origem mesenquimatosa, ou epitelial, dão origem a diferentes componentes dentro do mesmo tumor, e que cada tumor é proveniente de uma célula diferenciada específica, dentro do tecido salivar normal. Apoiando esta teoria estão as associações comuns entre AP e células do ducto intercalado, carcinomas de células escamosas e células do ducto excretório, oncocitomas e células do ducto estriado e carcinoma de células acinares e células dos ácinos (Thompson *et al*, 1996).

#### **4.3.2. Teoria bicelular ou monoclonal**

Esta hipótese sugere que uma única célula estaminal totipotente origina duas ou mais células que, posteriormente, sofrem uma diferenciação (Thompson *et al*, 1996).

Desde o início dos ensaios clínicos clonais, utilizando marcadores genéticos ligados ao cromossoma X, que diversos tipos de tumores (como os sarcomas do útero, mama e pâncreas) têm sido estudados através destes métodos biomoleculares, a fim de ser estabelecido um consenso acerca das teorias propostas. A maioria destes tumores mostrou uma origem celular comum, tanto na sua parte epitelial como na sua parte mesenquimatosa. Evidências semelhantes foram encontradas em AP das glândulas salivares. O AP é caracterizado pelo seu crescimento bifásico com regiões epiteliais e estromais. A primeira está organizada sob a forma de uma mistura organizada de células luminais e não luminais, enquanto a segunda região é composta predominantemente por células não-luminais evidenciando que uma célula progenitora comum dá origem a células epiteliais. Através de análises de ADN com técnicas de PCR demonstrou-se que tanto as células luminais como as não-luminais provém da mesma célula progenitora e que, apesar da diversidade fenotípica e morfológica das células não-luminais encontradas nas regiões estromais, estas possuem uma origem monoclonal (Lee *et al.*, 2000).

A hipótese monoclonal é também suportada pela frequente expressão cruzada dos marcadores epiteliais (tais como a citoqueratinas) nas células mesenquimatosas, e a presença de marcadores mesenquimatosos (por exemplo a vimentina) nas células epiteliais destes tumores, sugerindo que, apesar de morfologicamente distintos, apresentam uma origem semelhante (Takai *et al.*, 1995).

#### **4.3.2.1. Células estaminais cancerígenas**

Estudos recentes têm corroborado a hipótese monoclonal, evidenciando a existência de uma subpopulação de células tumorigênicas com propriedades semelhantes a células estaminais em vários tipos de tumores, inclusive em TGS. Embora esta hipótese tenha sido pela primeira vez sugerida há mais de 150 anos, foi apenas tida em consideração quando os estudos de Lapidot *et al.* (1994) identificaram uma população de células leucêmicas mielóides agudas semelhantes a células estaminais, em ratos imunocomprometidos, demonstrando que 1 em 250.000 células é uma célula precursora de leucemia. Esta hipótese foi validada, mais tarde, em tumores sólidos (Ginestier *et al.*, 2007).

Estas células, denominadas de células estaminais cancerígenas (CEC), são capazes de ações idênticas a células estaminais normais, tais como a auto-renovação, por meio de divisão assimétrica. Esta divisão é suportada pela ativação de vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento, tais como a via Notch, WNT e Hedgehog, pela diferenciação em múltiplas linhagens de células, que constituem a massa tumoral, pela expressão de atividade da telomerase bem como a expressão aumentada de proteínas transportadoras de membrana, e pela regulação positiva das vias anti-apoptóticas, por exemplo através da família de genes Bcl-2 ou através da resistência a estímulos apoptóticos da via TNF- $\alpha$ , anti-Fas e TRAIL. A inativação destes mecanismos apoptóticos contribui para a sobrevivência num microambiente hostil e à resistência à ação da maioria das terapêuticas anticancerosas, pelas CEC (Adams *et al.*, 2013; Sinha *et al.*, 2013).

A alteração da regulação do processo de autofagia contribui, também, para a progressão e resistência das CEC. A autofagia é um processo pelo qual células sob *stress* catabolizam os seus próprios constituintes, incluindo o seu conteúdo proteico e organelos citoplasmáticos, a fim de providenciar energia para os seus

processos de sobrevivência. Este processo funciona como um mecanismo supressor tumoral. Está demonstrada a baixa expressão de genes relacionados com a autofagia como por exemplo os genes Beclin-1, DAPK-1, UVRAG e PTEN, em carcinomas AC (Liang *et al.*, 2012).

Genericamente as CEC podem ser originadas por duas vias (ver anexo 3):

- a) Uma célula estaminal normal sofre uma mutação numa via de sinalização (Notch, WNT ou Hedgehog), uma alteração epigenética aberrante, uma alteração na P53 ou uma ativação de genes de auto-renovação, levando à criação de uma célula estaminal cancerígena;
- b) Uma célula diferenciada sofre um processo de “des-diferenciação”, quer por fatores externos como nicotina ou vírus, quer por um processo espontâneo somático (Burkert *et al.*, 2006; Alison *et al.*, 2008)

Embora o atual tratamento de quimioterapia se baseie na atuação indiscriminada sobre células cancerígenas, a hipótese das CEC revela que este poderia ser eficientemente erradicado tendo apenas estas células como alvo. Contudo existe evidência substancial de que estas possuem uma resistência intrínseca à ação farmacológica e à radiação, tornando as terapêuticas convencionais ineficazes no combate tumoral, explicando a sua recorrência, apesar da sua redução de volume ao longo do tratamento (Sinha *et al.*, 2013). A sobrevivência destas células é atribuída ao facto de se encontrarem habitualmente em fase G0, tornando-as relativamente quiescentes e dotando-as com uma capacidade de reação aos agentes quimioterapêuticos que atuam no ciclo celular, e à sua capacidade de executar uma sobrerregulação em proteínas de reparação de ADN, proteínas anti-apoptóticas e proteínas transportadoras (como o complexo ABCG2). As células endoteliais, fibroblastos e macrófagos possuem ainda um papel relevante na manutenção do microambiente, que permite a subsistência das CEC. Os macrófagos levam à ativação das células endoteliais via NF-kb, permitindo um aumento da expressão de genes associados à totipotência, mantendo assim o estado indiferenciado do tumor, e ao aumento da angiogénese, proporcionando nutrição ao tumor, conduzindo deste modo à perpetuação do nicho de células estaminais cancerígenas (Adams *et al.*, 2013).

Apesar de existirem bastantes estudos em vários tipos de carcinomas, a hipótese das CEC somente agora começa a ser explorada na área das GS. Alguns estudos conseguiram demonstrar esta hipótese em carcinomas AC, que mostraram alta concentração de um marcador conhecido das CEC denominado ALDH1. Estes estudos identificaram que tumores com maiores taxas de ALDH1 (logo CEC) possuíam maior capacidade tumorigénica, invasiva e metástica. Todavia são necessários estudos adicionais para esclarecer a importância e a veracidade do marcador ALDH1 na identificação de CEC em carcinomas AC, e se este é válido para outros TGS (Sun & Wang, 2010; Zhou *et al.*, 2013).

#### **4.4 Alterações Genéticas Específicas nos Tumores das Glândulas Salivares**

A genética molecular moderna permitiu expandir rapidamente o conhecimento acerca de tumores, levando a uma melhoria dos sistemas classificativos e a informação vital em relação ao seu tratamento e prognóstico. Independentemente do tipo de célula salivar inicialmente envolvida no processo neoplásico, uma vez que os fatores genéticos sejam modificados, estes irão dar início a mecanismos tumorigénicos, através da alteração da regulação das vias subsequentes ou da expressão génica, contribuindo assim para o seu comportamento histopatológico e clínico.

##### **4.4.1 Adenoma Pleomórfico**

Nos últimos anos novas perspetivas têm sido estabelecidas acerca dos fatores genéticos envolvidos na tumorigénese do adenoma pleomórfico das GS. Estudos citogenéticos extensos revelaram uma alta especificidade de alterações cromossómicas neste tipo de tumor. Em aproximadamente 70% dos AP é identificada uma anomalia genética, sendo que pode ser enquadrada numa das três seguintes categorias: 1) Rearranjos envolvendo o cromossoma 8q12; 2) Rearranjos envolvendo o cromossoma 12q13-15 3) Alterações clonais esporádicas que não envolvem nem o cromossoma 8q12 nem o cromossoma 12q13-15. Cerca de 30% dos AP aparentam possuir um cariotipo normal (Cheuk&Chan, 2007).

O gene-alvo no cromossoma 8q12 é denominado de PLAG1, que mostra algum tipo de amplificação ou rearranjo em 85-90% dos AP (Martins *et al.*, 2005;

Persson *et al.*, 2008). Este codifica uma proteína que contém 7 domínios do tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc-finger e um terminal carboxílico rico em serina, que exibe capacidades de transativação quando ocorre uma fusão com o domínio de ligação de ADN Gal4, sugerindo que esta proteína pode atuar como fator de transcrição. Este gene encontra-se especialmente ativo durante o desenvolvimento fetal, com expressão regulada restrita a apenas a alguns tecidos embrionários (Voz *et al.*, 1998; Aström *et al.*, 1999; Voz *et al.*, 2000). Múltiplas linhas de investigação sugerem uma sobrerregulação do fator de crescimento IGF-II nos TGS, fator resultante da transcrição do gene PLAG1. Cinco potenciais sítios de ligação para o PLAG1 foram identificados no IGF-II, existindo ainda uma expressão aumentada deste fator de crescimento nas células com sobreexpressão do gene PLAG1, sem no entanto ser possível detetar tal expressão nas células com ausência de alterações no gene, sugerindo assim que a atividade oncogénica do PLAG1 resulta da regulação positiva da expressão de IGF-II, conhecida por estimular a proliferação celular nos tumores humanos através de mecanismos autócrinos ou parácrinos (Voz *et al.*, 2000). Em contraste com os tumores benignos, os rearranjos no gene PLAG1 foram observados num número limitado de tumores malignos, sendo a maioria dos casos relativos a carcinomas ex-adenomas pleomórficos, mostrando a sua especificidade para os AP (Jin *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2005).

Ambas as origens celulares que constituem um AP – epitelial e mioepitelial – contém rearranjos no gene PLAG1, indo de encontro à teoria bicelular/monoclonal, em que uma célula totipotente origina as diferentes células tumorais (Debiec *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2005; Asp *et al.*, 2006).

Vários genes têm sido confirmados como envolvidos na fusão com o gene PLAG1, destacando-se os genes CTNNB1, CHCHD7, LIFR, FGFR1 e o gene TCEA.

A fusão CTNNB1-PLAG1 (ver anexo 4: figura.1) é descrita como a mais recorrente, ocorrendo entre 40 a 70% dos casos em que existe algum tipo de alteração genética no PLAG1 (Kas *et al.*, 1997; Matsuyama *et al.*, 2011). O gene CTNNB1 encontra-se no cromossoma 3p21, codificando uma proteína  $\beta$ -catenina. Esta encontra-se na interface das junções aderentes celulares, funcionando ainda como mediador na via de sinalização WG/WNT. A  $\beta$ -

catenina tem igualmente sido implicada em vários processos de tumorigénese (Willert & Nusse, 1998). Uma análise da sequência nucleótida através de PCR revelou a fusão entre o exão 1 do gene CTNNB1 e o exão 2 ou 3 do gene PLAG1. Esta fusão é descrita como uma translocação do tipo t(3;8)(p21;q12), conduzindo ao aumento da expressão do PLAG1 e à redução da expressão do gene CTNNB1 (Matsuyama *et al.*, 2011).

Uma outra fusão comum no gene PLAG1 é aquela que ocorre com o gene CHCHD7, criada por rearranjos citogenéticos, nos AP. O CHCHD7 é um membro pertencente à família de proteínas que contém um domínio conservador do tipo (coiled coil 1)-(helix 1)-(coiled coil 2)-(helix 2), recentemente identificado. É expresso através de um transcrito único com cerca de 2kb ao nível do coração, cérebro, placenta, pulmão, fígado, músculo esquelético, rim, pâncreas e GS. A sua função biológica é desconhecida. No entanto, não foi relacionado ainda com outro tipo de tumor, para além do AP. Ambos os genes encontram-se no cromossoma 8q12, distanciando-se apenas por 500bp. A sua fusão ocorre através de uma inversão paracêntrica, no terminal 5' não-codificante, com fusão do exão 1 do gene CHCHD7 com o exão 3 e 4 ou 2, 3 e 4, do gene PLAG1, conduzindo, assim como no caso da fusão CTNNB1-PLAG1, a um aumento da expressão do gene PLAG1 (Asp *et al.*, 2006; Matsuyama *et al.*, 2011).

A translocação t(5;8)(p13;q12) leva à expressão ectópica de um transcrito quimérico, que consiste em sequências do gene LIFR e o gene PLAG1. O gene LIFR codifica o recetor para o fator inibidor da leucemia, um membro multifuncional da família das IL-6, e que se encontra envolvido na diferenciação, sobrevivência e proliferação de uma ampla variedade de células embrionárias e no adulto, incluindo células das GS (Voz *et al.*, 1998). A fusão ocorre ao nível da região terminal não codificante 5', idêntico ao ocorrido na t(3;8) entre os genes CTNNB1-PLAG1. O gene LIFR passa a regular o gene PLAG1, atuando como seu promotor, aumentando a expressão do PLAG1, e, concluindo-se assim, este ser um mecanismo tumorigénico nos AP com alterações genéticas no cromossoma 8q12 (Voz *et al.*, 1998; Cheuk&Chan, 2007; Matsuyama *et al.*, 2011).



Outras alterações do gene PLAG1 incluem as modificações intracromossômicas que resultam da sua fusão com o gene TCEA1 e FGFR. O gene TCEA1, também conhecido como SII, localiza-se no cromossoma 8q12 a 2 Mb do gene PLAG1, sendo este rearranjo similar à fusão CHCHD7-PLAG1 (Asp *et al.*, 2006; Matsuyama *et al.*, 2011). A sua função passa pela codificação do fator de enlogação SII, que pertence ao grupo de fatores de enlogação da RNA polimerase II, envolvidos na regulação da translocação da maioria, se não de todos os genes codificantes de proteínas eucarióticas, prevenindo, em última instância, o término prematuro da RNA polimerase II, durante a transcrição (Aström *et al.*, 1999). A fusão FGFR1-PLAG1 resulta de uma amplificação de um segmento pericentromérico de 19 Mb e da conjugação do exão 1 do primeiro gene, com o exão 2 ou 3 do segundo gene, com ativação da expressão do gene PLAG1, devido à substituição do seu promotor (Persson *et al.*, 2008).

Aproximadamente 12% dos AP das GS são caracterizados por alterações genéticas no cromossoma 12q 13-15. O gene-alvo mais comum é o HMGA2 (anteriormente conhecido como HMGIC - ver anexo 4: figura.2), que codifica um dos grupos proteicos com maior mobilidade – o componente da cromatina que não se encontra associado a histonas (Geurts *et al.*, 1998). A expressão do gene HMGA2 é rigorosamente controlada, detendo alta expressão ao nível dos tecidos embrionários, sendo indetectável no adulto. Este gene é constituído por uma local de ligação à *minor groove* do ADN, sugerindo-se que atua como um fator estrutural no núcleo celular. A relação causal entre as anormalidades genéticas que afetam o gene HMGA2 e o crescimento tumoral, ainda não foi inteiramente estabelecida (Grosschedl *et al.*, 1994).

Foi identificada a existência de uma fusão entre o gene HMGA2 e o gene NIFB. Este encontra-se no cromossoma 9q23, uma região conhecida como frequentemente associada à sua translocação com o cromossoma 12q 13-15. As análises genéticas dos transcritos revelaram uma inserção do tipo ins(9;12)(p23;q12q15), que resulta da substituição de um segmento carboxil-terminal do gene HMGA2 pelos últimos 5 aminoácidos do gene NFIB nos AP das GS (Geurts *et al.*, 1998). O NIFB é um membro da família de genes que codificam fatores nucleares humanos, contendo um domínio de ligação para o

ADN<sub>2</sub> pelo que a modificação da sua atividade pode explicar o seu papel na tumorigénese nos AP das GS (Cheuk&Chan, 2007).

Outro gene também associado à translocação com o gene HMGA2 é o gene FHIT, que se localiza no cromossoma 3p14.2, obtendo-se uma translocação do tipo t(3;13)(p14;q12-15). O evento consequência desta alteração assemelha-se ao anteriormente descrito – existe uma separação dos domínios de ligação do ADN das proteínas codificadas pelo gene FHIT, das zonas de mRNA potencialmente desestabilizadoras localizadas no 3' UTR, com desregulação da expressão da oncoproteína HMGA2 (Geurts *et al.*, 1997). Alguns estudos reportam ainda a translocação HMGA-WIF1, com fusão entre o exão 3 do gene HMGA2 e o exão 9 do gene WIF, resultando na amplificação do oncogene consequente (Persson *et al.*, 2009; Matsuyama *et al.*, 2011). Baseado na orientação transcripcional dos dois genes, é possível teorizar que esta fusão é gerada por uma inversão paracêntrica. Estes resultados encontra-se em linha com as restantes alterações genéticas descritas para o gene HMGA2, enfatizando a importância da perda de regulação das sequências localizadas no 3' UTR, para a ativação/expressão ectópica do gene HMGA2, resultando no aumento de expressão e alterações da propriedade deste oncogene (Persson *et al.*, 2009). A elevada expressão de HMGA2, resultante da sua amplificação génica, demonstra um papel relevante na transformação maligna em AP (Roijs *et al.*, 2002).

Citogeneticamente, todas as alterações abordadas são similares quer nas GS *major*, quer nas GS *minor*, sem diferenças significativas (Manor *et al.*, 2012).

Outros marcadores genéticos não diretamente envolvidos na tumorigénese dos AP, todavia relevantes para o assunto abordado incluem o gene da  $\alpha$ -defensina humana (DEFA) e o marcador Ki-67. As defensinas pertencem à subfamília dos AMP's, que são constituintes importantes no componente inato do sistema imunitário. Uma diminuição da expressão génica da DEFA 1/3 e 4 é passível de constituírem um fator de proteção nos AP contra a evolução maligna para adenocarcinoma (Winter *et al.*, 2012).

#### 4.4.2 Carcinoma Adenóide Cístico

São numerosos e díspares os estudos existentes na literatura, que descrevem as alterações genéticas encontradas neste tipo de tumor, com identificação de um elevado número de genes possivelmente envolvidos na tumorigênese e progressão do carcinoma AC. Por esta razão, nenhuma revisão sistemática alcançou até agora uma compilação adequada de todos os possíveis fatores genéticos cuja expressão encontra-se alterada no carcinoma AC, comparativamente a tecidos salivares saudáveis. Dois pontos fundamentais contribuem para este evento, que também são válidas para muitas outras formas cancerígenas: o carcinoma AC é um tumor relativamente incomum, sendo as amostras usadas em estudos clínicos frequentemente encontradas sob a forma de amostras fixadas em formalina/parafina; em segundo lugar, trata-se de um tumor de difícil diagnóstico que exige uma cuidada análise microscópica.

As deleções nos cromossomas 6q23, 12q, 13q21-22, 17p13 e 19q estão reportadas como as mais consistentes no carcinoma AC, não constituindo simplesmente deleções aleatórias. Não existe, todavia, estudos clínicos com evidência suficiente para a confirmação do seu papel determinante na tumorigênese e quais os genes supressores tumorais envolvidos nestes segmentos cromossômicos adulterados (Nordkvist *et al.*, 1994; Jonhs *et al.*, 1996; Martins *et al.*, 1996; El-Rifai *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2001; Freier *et al.*, 2005; Ruthefort *et al.*, 2005).

Ganhos de material genético são observados nos cromossomas 7,8, 19 e 22 (Martins *et al.*, 1996; El-Rifai *et al.*, 2004; Freier *et al.*, 2005). Os proto-oncogenes presentes no cromossoma 22q que sofre ganho genético incluem o fator de regulação WNT7 (pertencente à via de sinalização WNT), e as proteínas PDGFB e FBLN1 (proteína da matriz extracelular pertencente à família da fibulina) (Freier *et al.*, 2005).

Um rearranjo específico tem sido associado a carcinomas AC – a translocação do tipo t (6;9) (q21-24;p13-23) (Martins *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 2001; Rutheford *et al.*, 2005). Esta modificação resulta na fusão dos genes que codificam o fatores de transcrição MYB e NFIB, expressando-se em cerca de metade dos carcinomas AC das GS. Esta modificação não é identificável noutros tipos de TGS

ou em células salivares saudáveis (West *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2013). A ausência de metilação da região promotora do gene MYB confirma que a elevada expressão em células pertencentes a carcinomas AC resulta de uma translocação genética e não apenas de uma hipermetilação (Shao *et al.*, 2011). Inúmeros estudos já desenvolvidos estabelecem o papel biológico do MYB no desenvolvimento e diferenciação celular. Por outro lado, pouco se sabe sobre o seu papel na tumorigénese em humanos. Demonstrou-se que a expressão de MYB é restrito no fenótipo de células basais do carcinoma AC. Este facto é surpreendente, na medida em tanto as células basais e luminais contém a translocação MYB-NFIB. Estes resultados sugerem que existem mecanismos reguladores intactos nestas células neoplásicas, que poderão ter a capacidade de desligar a expressão do transcrito de MYB-NFIB e/ou de regular os níveis da proteína resultante da fusão. É possível que as células oncogenicamente ativas (incluindo as células tumorais estaminais) estejam presentes principalmente na população de células basais. Observa-se ainda uma maior tendência para invasão perineural e recorrência local em pacientes com a translocação MYB-NFIB (West *et al.*, 2011).

O proto-oncogene C-Kit codifica um recetor transmembranar tirosina quinase (CD117), estruturalmente semelhante com o recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). O seu ligando, conhecido como fator de crescimento de células estaminais, está envolvido em processos primários da hematopoese, que suportam o crescimento e a diferenciação destas linhagens celulares. Em humanos, o gene C-Kit situa-se no cromossoma 4q12, adjacente ao recetor PDGF. Adicionalmente, a proteína C-Kit e o seu ligando são necessários para a migração e desenvolvimento de melanócitos. A sua ativação promove uma cascata de fosforilação, que em última instância, conduz à ativação de vários fatores de transcrição que regulam a apoptose. A expressão de C-Kit tem sido extensamente documentada nos carcinomas AC, exibindo expressão em 67 a 100% dos casos (Jeng *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 2003; Freier *et al.*, 2005<sup>1</sup>; Vila *et al.*, 2009).

Análises moleculares a amostras de carcinoma AC mostram mutações pontuais *missense* no gene C-Kit no exão 11, e menos frequentemente nos exões 9,13 e 17, sugerindo o envolvimento da proteína Kit na patogénese desta neoplasia das GS. Esta especificidade apresenta uma significância clinico patológica, que

resulta em diferentes respostas ao tratamento com inibidor da tirosina quinase. Mutações no domínio justamembranar (localizado no exão 11) ou no domínio extracelular (exão 9) mostram responder à terapia com imatinib (inibidor da tirosina quinase). No entanto, as áreas com mutações nos exões 13 e 17 são predominantemente resistentes a tal terapia (Frost *et al.*, 2002; Freier *et al.*, 2005<sup>1</sup>; Vila *et al.*, 2009). Porém, os dados acerca da ativação de C-Kit são inconsistentes – outros estudos confirmam o seu revelante papel na tumorigénese mas apontam para a ausência de mutações na proteína, apesar da corroboração da sua sobreexpressão nesta neoplasia, indiciando outro mecanismo de ativação (Jeng *et al.*, 2000). A expressão de c-Kit encontra-se ainda relacionada com a expressão de um fator de transcrição *zinc finger* descoberto recentemente – o SLUG (Snail2). A sobreexpressão de ambos correlaciona-se com estádios TNM mais avançados, invasão perineural, recidiva local e metástases à distância. Estes resultados fornecem pistas acerca do modo como a c-Kit pode contribuir para a patogénese do carcinoma AC e originar áreas para futuras pesquisas (Tang *et al.*, 2010). Apesar da elevada expressão de C-kit no carcinoma AC, estudos indicam que esta não é restrita a este tumor, encontrando-se presente em adenocarcinomas polimórficos de baixo grau e adenomas monomórficos, eliminando assim a potencialidade de ser usado como marcador específico neste carcinoma (Edwards *et al.*, 2003).

O carcinoma AC foi anteriormente designado como cilindroma, pelo seu marcado comportamento histológico semelhante ao cilindroma dérmico. Estudos moleculares de cilindromas esporádicos e familiares mostram alterações no cromossoma 16q 12-13, que alberga o gene da cilindromatose (CLYD). Este é um gene supressor tumoral, com atividade enzimática que inibe a ativação do fator de transcrição NF-kB, que por sua vez, desempenha um papel fundamental na inflamação, reações imunológicas, tumorigénese e proteção contra a apoptose. Na maioria das células, o NF-kB é mantido inativo no citoplasma, por meio de uma associação com inibidores IκB. Após a estimulação por vários fatores, o inibidor IκB é fosforilado pelo complexo cinase IκB (IKK) e degradado pelo proteassoma, permitindo que o NF-kB se desloque para o núcleo, ativando o seu gene alvo. A expressão de CLYD e NF-kB encontra-se aumentada no carcinoma AC, pela estimulação de TNF-α (ver anexo 5). Isto indica que CYLD não inibe a atividade

de NF- $\kappa$ B, o que sugere que a perda de função do gene CYLD está associada à tumorigênese no AC, incluindo o seu crescimento, desenvolvimento e invasão perineural. Serão necessárias investigações futuras acerca do papel do gene CLYD, incluindo a sua interação com os fatores relacionados com a via NF- $\kappa$ B, e uma análise das alterações genéticas em células do carcinoma AC, a fim de se estabelecerem estratégias terapêuticas contra esta neoplasia, baseadas nesta modificação (Fukuda *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2008)

A via de sinalização WNT é essencial para o normal desenvolvimento humano e organogênese. A sua ativação desadequada resulta no deslocamento para o núcleo da  $\beta$ -catenina, estando associada com o desenvolvimento de vários tipos de neoplasmas, nomeadamente o carcinoma AC, através da estimulação da expressão de genes envolvidos no ciclo celular, como a ciclina D1 e o gene MYB. Cerca de 35% dos AC exibem mutações nos genes componentes da via WNT, designadamente os genes CTNNB1, AXIN1 e APC, resultando na fuga da  $\beta$ -catenina à degradação. A sua acumulação durante a via leva à sua desajustada função como ativadora de fatores de transcrição. Estas mutações foram detetadas com maior frequência no componente sólido, comparativamente ao componente tubular e cribiforme (Daa *et al.*, 2004). Outro estudo indica ainda sobreexpressão os genes caseína cinase-1 e frizzled-7, ambos relacionados com a via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina (Frierson *et al.*, 2002).

São ainda relatadas mutações nos genes codificantes de reguladores do estado da cromatina como os genes SMARC2, CREBBP e KDM6A, propondo a existência de uma regulação epigenética aberrante na oncogénese do carcinoma AC (Ho *et al.*, 2013).

A MDM2 é um proto-oncogene que, quando exhibe sobreexpressão ou é amplificado, torna-se capaz de inativar a função da p53 (uma conhecida fosfoproteína supressora tumoral nuclear), dando início a um processo de tumorigênese. Simultaneamente, a proteína pKTA está associada à atividade da MDM2, sendo fundamental para o seu correto funcionamento. Os estudos clínicos mostram que ambas as proteínas encontram-se expressas no carcinoma AC, com uma ação concomitante, relacionando-as com a sua tumorigênese, mas não diretamente com a progressão tumoral (Araújo *et al.*, 2000; Mantesso *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2009).

Um outro grupo de genes que são implicados na tumorigénese de carcinomas AC, é a família dos fatores de crescimento, que inclui os fatores de crescimento epidérmico (EGFs) e os seus recetores (EGFR), fatores de crescimento endotelial e vascular (VEGF) e os seus recetores (VEGFR), e fatores de crescimento do nervo (NGFs). Na família EGFR, o fator ErbB1 é identificado como sobreexpresso nesta neoplasia (Vered *et al.*, 2002). Enquanto a expressão do proto-oncogene HER2 (ErbB2) parece ser um bom marcador para carcinomas do ducto salivar, a sua expressão em carcinomas AC mostra-se controversa (Shintani *et al.*, 1995; Dori *et al.*, 2002; Glisson *et al.*, 2004). Os ligandos desta família promovem a sobrevivência celular, a proliferação, a angiogénese e metastização, quando no estado de doença. Mais recentemente, a sobreexpressão de epirregulina, um novo membro da família EGF, mostra capacidade de promover a migração e invasão *in vitro* de uma linha celular com baixa capacidade de metastização. Os efeitos de epirregulina acredita-se serem mediados pela ativação de ERK1/2, Akt, e Cox 2, mas outras distintas vias de sinalização de células mostraram aptidão para a sua ativação (Hu *et al.*, 2009). No carcinoma AC, a expressão de EGFR está relacionada com o nível histológico mas não com o prognóstico do paciente (Monteiro *et al.*, 2009). Isto sugere que o EGFR pode estar envolvido na patogénese tumoral do AC, mas a sua relação é complexa e requer uma investigação mais aprofundada.

O VEGF é amplamente reconhecido como um fator angiogénico em vários tipos tumorais, mas o seu papel específico no carcinoma AC apenas recentemente tem sido explorado. A sua expressão é regulada pela via NF- $\kappa$ B, já descrita anteriormente como importante na tumorigénese deste carcinoma. Vários estudos demonstram uma sobrerregulação da expressão de VEGF, com aumento da densidade da microvascularização no carcinoma AC (Zhang & Peng, 2009).

Um achado frequente neste tipo de tumor é a invasão perineural, que resulta no agravamento do prognóstico por propagação tumoral ao longo dos nervos invadidos. A evidência científica sugere que os fatores BDNF e NGF, duas proteínas pertencentes à família das neurotropinas, facilitam essa invasão, e são identificadas em amostras de carcinomas AC (Kowalski & Paulino, 2002; Wang *et al.*, 2006).

A proteína p53, cujo gene codificante se localiza no cromossoma 17p13, é a proteína mais regularmente identificada como mutada, nas neoplasias humanas. No caso de dano no ADN, esta irá acumular-se no núcleo e induzir a paragem na fase G1 do ciclo celular, através da indução da proteína p21, uma potente inibidora de quinases ciclina-dependentes. Se a reparação do ADN não for bem-sucedida, a p53 desencadeará um processo de apoptose (Hollstein *et al.*, 1999). Células que albergam mutações na p53 permitirão que o ADN danificado continue a sua replicação, incapazes de induzir apoptose. Estas mutações podem-se acumular, conduzindo a um processo de tumorigénese. A perda da sua atividade funcional encontra-se demonstrada em diversos tipos de neoplasias e possui associação com o carácter mais agressivo e recorrente do carcinoma AC, sugerindo que o papel mutacional da p53 pode não ser crítico no processo tumoral prematuro, mas com maior relevância em fases posteriores, durante a progressão e recorrência. A sua expressão é díspar, variando consoante os estudos, sendo que entre os 17% a 69% das amostras demonstram uma expressão positiva (Papadaki *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 1996; Kärjä *et al.*, 1997; Kiyoshima *et al.*, 2001). Estas discrepâncias podem dever-se em grande parte às diferenças de sensibilidade nos métodos usados na deteção da expressão da p53. Porém, são necessários estudos adicionais para determinar a exata importância desta proteína na tumorigénese do carcinoma AC.

#### **4.4.3 Carcinoma Mucoepidermóide**

Inúmeros estudos citogenéticos acerca de carcinomas ME originados nas GS *major* e *minor* têm revelado a presença recorrente da translocação recíproca t(11;19), quer fazendo parte de uma anormalidade complexa do seu cariótipo, quer ocorrendo como uma anormalidade cromossómica isolada. Esta translocação resulta da fusão do exão 1 do gene CTSC1 (também conhecido como METC1, TORC1 ou WAMTP1) no cromossoma 19p13, com os exões 2-5 do gene MAML2, situado no cromossoma 11q21, criando um novo oncogene – CRTC1-MAML2 – que codifica um novo transcrito proteico (Tonon *et al.*, 2003; Enlund *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2004).



Apesar do papel exato do oncogene CRTC1-MAML2 continuar por esclarecer, os estudos moleculares sugerem que o seu transcrito possui uma função nos estádios iniciais da tumorigénese dos carcinomas ME (Kaye, 2006; Jaskoll *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011). A proteína originada por ambos os constituintes desta translocação está envolvida na regulação do ciclo celular, sob a sua forma estrutural normal, sem modificações genéticas. O gene CRCT1 codifica um co-fator que funciona como elemento de ligação em resposta ao cAMP (AMP cíclico) – o co-ativador CREB – que regula a expressão génica envolvida na proliferação e diferenciação celular, em resposta a estímulos originados por citocinas e fatores de crescimento (Mayr & Montemiró, 2001). Este co-fator surge no epitélio das GS durante os estádios iniciais da sua morfogénese, desaparece com a diferenciação, ressurgindo na fase inicial dos TGS, nomeadamente dos carcinomas ME. Esta expressão dependente do estágio sugere que o gene CRTC1 possui um papel durante a embriogénese das GS mas não durante a sua diferenciação, apoiando a teoria bicelular, em que uma única célula percursora é responsável pela tumorigénese do carcinoma ME (Jaskoll *et al.*, 2011).

Por outro lado, o gene MAML2 é um membro da família dos genes Mastermind-like, amplamente expressados nos tecidos, cuja função é a de co-ativação dos recetores Notch (Nordkvist *et al.*, 1994; Horsman *et al.*, 1995; Martins *et al.*, 2004). A sinalização Notch tem um complexo papel na proliferação e diferenciação celular. A sua ação depende do contexto em que se encontra – dos estímulos recebidos e tipos celulares presentes - atuando quer como oncogene, quer como supressor tumoral (O'Neill, 2009). Os mecanismos moleculares subjacentes à atividade do transcrito CRTC1-MAML2 são complexos, sendo atualmente alvo de vários estudos científicos. Genes ligados à via Notch implicados nas decisões celulares, incluindo os genes HES1 e HES5, sofrem uma sobrerregulação nas linhas celulares, nos carcinomas ME com a translocação CRTC1-MAML2 (Tonon *et al.*, 2003; Enlund *et al.*, 2004). Neste contexto, a ativação da via Notch é independente de ligantes diretos, que estimulam a via, conseguindo induzir a proliferação epitelial numa linhagem denominada RK3E (células epiteliais imortalizadas por adenovírus, usadas no estudo das alterações genéticas associadas ao carcinoma ME) (Tonon *et al.*, 2003). O transcrito originado pela fusão CRTC1-MAML2 induz ainda a expressão de vários genes-

alvo na via CREB, propondo um mecanismo alternativo da expressão mediada pelo cAMP. Tais achados sugerem que a mutação CRTC1-MAML2 pode atuar pela interrupção de ambas as vias – Notch e CREB (Coxon *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2005).

A prevalência da translocação t(11;19) varia consoante os estudos, sendo que 38% a 81% dos carcinomas ME mostraram-se positivos para esta alteração genética (Martins *et al.*, 2004; Behboubi *et al.*, 2006; Okabe *et al.*, 2006; Tirado *et al.*, 2007). Esta significativa discrepância pode ser explicada pela diferente natureza das amostras usadas nos estudos – o carcinoma ME é caracterizado por uma extensa versatilidade do seu aspeto histológico, variando entre o baixo e alto grau de malignidade. A deteção deste transcrito é com maior frequência observada nos casos de baixo grau, sendo este um fator que poderá influenciar a prevalência da translocação, caso a amostra contenha uma maioria de casos de alto grau (Behboudi *et al.*, 2006; Okabe *et al.*, 2006). Por outro lado, menores taxas de deteção do transcrito são associadas a estudos que recorreram a uso de biópsias embebidas em parafina, comparativamente a estudos que optaram por tecidos frescos congelados (Tirado *et al.*, 2007).

Estes resultados demonstram uma importante diferença biológica entre os tipos histológicos tumorais de baixo grau e alto grau, sendo que a deteção da fusão CRTC1-MAML2 poderá estar associada com o comportamento do tumor, valorizando-se a identificação do transcrito com finalidade prognóstica. Pacientes com carcinomas ME positivos para a fusão CRTC1-MAML2 mostram correlação com um risco reduzido de recorrência e de metastização, com maior taxa de sobrevivência a longo prazo (Behboubi *et al.*, 2006; Okabe *et al.*, 2006; Tirado *et al.*, 2007). Esta diferença biológica entre carcinomas ME positivo/negativos para a fusão CRTC-MAML2 é nitidamente relevante, requerendo investigação futura, para uma melhor assimilação do seu papel tumorigénico, aplicando esse conhecimento à área terapêutica, por exemplo através de inibidores Anti-Notch (Tonon *et al.*, 2003) ou através da interferência das vias do mRNA (Komiya *et al.*, 2005).

Uma outra fusão – CRTC3-MAML2 – foi detetada em 6% dos carcinomas ME. Similarmente à fusão CRTC1-MAML2, as amostras positivas para este transcrito apresentam características clinico-patológicas que sugerem um melhor

prognóstico – estágio clínico menos avançado, ausência de metástases, baixo grau histológico, ausência de recorrência tumoral e maior taxa de sobrevivência. É interessante notar que os pacientes com tumores positivos para o transcrito CRTC3-MAML2 são expressivamente mais novos (média de 36 anos de idade) do que aqueles com a fusão CRTC1-MAML2 (média de idades de 55 anos), e do que pacientes com tumores negativos para qualquer uma das fusões (média de 58 anos). Em conclusão, a fusão CRTC3-MAML2, que apenas ocorre mutuamente com a fusão CRTC1-MAML2, sendo específica para o carcinoma ME, pode ser detetada com maior frequência do que o anteriormente esperado (Nakayama *et al.*, 2009).

#### 4.4.4 Tumor de Warthin

O tumor de Warthin (TW) é um tumor benigno que possui uma aparência histomorfológica característica. Embora denominado como tumor, a sua etiologia é controversa – permanece a dúvida se se trata de verdadeiras neoplasias que surgem como proliferações clonais, ou se representam distúrbios de desenvolvimento com origem não-neoplásica. Apesar dos estudos mais recentes iniciarem a abordagem a esta questão, os resultados têm se mostrados inconsistentes.

Entre os estudos que apontam alterações genéticas, encontra-se o que aborda a modificações estruturais presentes nas mitocôndrias das células oncocíticas no TW, que reduzem a sua atividade metabólica. A relação etiológica estabelecida entre esta neoplasia e hábitos tabágicos pode ser a razão para o *stress* oxidativo induzido sobre as mitocôndrias, levando a alterações genéticas. Observa-se que cerca de 10% das mitocôndrias possuem uma deleção ao nível da 4977bp, sendo que as amostras provenientes de pacientes fumadores mostram maior incidência desta deleção (Lewis *et al.*, 2000).

A translocação t(11;19)(q21;p13), descrita anteriormente no carcinoma ME, é também detetada, em alguns estudos, em TW (Martins *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 2004; Fehr *et al.*, 2007; O'Neill, 2009). No entanto, apenas um pequeno número de amostras de TW é positiva para esta translocação, encontrando-se associadas a casos de metástases ou sobreposição com o carcinoma ME.

Por outro lado, existem argumentos em favor da natureza não-neoplásica do TW. Foi anteriormente apresentada a teoria monoclonal, postulando que todos os TGS possuem origem numa célula única. Estudos através da técnica de HUMARA detetaram que o componente epitelial do TW tem origem numa população de células policlonais, assim como o seu componente linfoide é constituído por subconjuntos heterogéneos (Honda *et al.*,2000). Outro estudo indica ainda que as alterações clonais são negligenciáveis a nível do genoma, expressão proteica ou para uma pluralidade de genes supressores tumorais (Arida *et al.*,2005).

## **4.5 Alterações inespecíficas nos tumores das glândulas salivares**

### **4.5.1 P63 (Ver anexo 6)**

O gene p63, um homólogo do gene supressor tumoral p53, localiza-se no cromossoma 3q27-29, codificando pelo menos seis diferentes proteínas, com funções biológicas distintas. Ao contrário da p53, as mutações somáticas no gene p63 são raras (Weber *et al.*, 2002). Os isotipos da p63 são produzidos por dois tipos de promotores (TA e  $\Delta N$ ) e por três alternativos *splice sites* no domínio carboxil-terminal ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). As principais isoformas, TAp63 e  $\Delta Np63$ , diferem na presença ou ausência de um domínio amino-terminal do gene, respetivamente. A primeira isoforma ativa os genes-alvo da p53 (p21, mdm2 e bax), bloqueia a progressão do ciclo celular, promovendo a apoptose. Opostamente, a isoforma  $\Delta Np63$  atua negativamente, inibindo a ativação transcricional do gene p53 (Yang *et al.*, 1998; Dohn *et al.*,2001). Este fator possui um papel fundamental no desenvolvimento do epitélio escamoso estratificado e as estruturas com ele relacionado. Estudos moleculares mostram que uma sobreexpressão destas isoformas está associadas com aparências clinicopatológicas diferentes, em carcinomas humanos, inclusive TGS (Maruya *et al.*, 2005). Ambas as isoformas mostram maior expressão em tumores com um componente mioepitelial e/ou basal, encontrando-se ausentes em tecidos salivares saudáveis (Edwards *et al.*,2004).

Nas células dos TGS, a alta expressão no isotipo  $\Delta N$  leva a um aumento da migração e invasão celular, com um papel negativo sobre a segunda isoforma, assinalando tumores com um comportamento mais agressivo, nomeadamente tumores malignos como o carcinoma ME e AC, enquanto a incidência de TGS com alta expressão de TAp63 é significativamente menor, e com carácter indolente (Maruya *et al.*, 2005; Mitani *et al.*, 2011). Estes dados relatam a contribuição da sobreexpressão da isoforma  $\Delta Np63$  para a tumorigénese salivar, nomeadamente na transformação maligna, e o seu papel oncogénico pode representar um atrativo alvo terapêutico em pacientes com carcinomas das GS (Foschini *et al.*, 2005).

## 5. Discussão de Resultados

Os TGS representam um grupo de neoplasias relativamente raras dentro do panorama das doenças oncológicas, correspondendo a cerca de 3-10% dos tumores da zona de cabeça e pescoço. Estes compõem um grupo com uma variedade de comportamento biológicos complexos, com vários subtipos histológicos heterogêneos, que tornam difícil a sua identificação clínica, que é, em muitos casos, já tardia, e consequentemente, a sua classificação.

Apesar dos avanços na área da citogenética e histoquímica, que culminou em várias publicações científicas sobre o tema nos últimos anos, e da descoberta de novos marcadores genéticos envolvidos na tumorigénese e na progressão dos TGS, a sua etiologia ainda permanece incerta. A literatura mostra a complexidade sob o ponto de vista histológico, resultante da diferenciação de uma origem celular única, como mostra a teoria bicelular/monoclonal, sendo esta a hipótese mais aceite atualmente, explicativa das origens celulares nos TGS, também válida em outros tipos tumorais.

Esta complexidade está também inerente nos fatores genéticos envolvidos na tumorigénese dos TGS. Deparamo-nos com uma ampla variedade de genes que possuem modificações genéticas, encontrando-se diretamente ligados a vias de sinalização, ao ciclo celular ou fatores de crescimento. Uma vez modificados, estes fatores induzem alterações nas GS, que culminam com a formação de linhagens celulares de células estaminais cancerígenas, as precursoras das neoplasias salivares. É a especificidade e a elevada recorrência de algumas destas modificações genéticas que torna relevante a revisão elaborada acerca deste tema, a fim de se estabelecer os TGS como um tipo tumoral particular, com características distintas dos demais tumores.

No AP, o gene *PLAG1*, tal como o seu nome indica, demonstra essa especificidade, encontrando-se alterado em cerca de 85-90% dos casos (Martins *et al.*, 2005; Persson *et al.*, 2008). Este gene possui expressão fisiológica restrita a alguns tecidos embrionários durante o período fetal. A proteína resultante da sua transcrição é essencial na regulação de processos fisiológicos inerentes à sobrevivência celular (Voz *et al.*, 1998; Aström *et al.*, 1999; Voz *et al.*, 2000). Deste modo, a sua expressão fora deste período é vista como patológica, ligada à proliferação celular desregulada. Entre os genes que apresentam-se frequentemente translocados com o gene *PLAG1*, encontram-se o *CTNNB1*, *CHCHD7*, *LIFR*, *FGFR1* e *TCEA*. Todas estas translocações possuem um resultado idêntico entre si: o aumento da expressão do gene *PLAG1*. Destas translocações, destaca-se a t(3;8)(p21;q12) – a correspondente ao gene *CTNNB1*. Deve ser prestada uma especial relevância a esta, pela sua maior frequência. Este gene codifica a  $\beta$ -catenina, um fator de transcrição, que é transportado do citoplasma para o núcleo, como resposta a ligantes da via de sinalização WNT. Uma vez no núcleo, estimula a expressão de importantes genes envolvidos no crescimento e proliferação celular, como a ciclina (Clevers&Nusse, 2012). A mutação do gene *CTNNB1* resulta na perda de função, tornando a sua degradação impossível. Por esta razão, a  $\beta$ -catenina é transportada para o núcleo sem influência de estímulos externos, estimulando continuamente a transcrição dos genes-alvo da via WNT, contribuindo deste modo para o processo tumorigénico. São ainda detetados em AP rearranjos no cromossoma 12q14-15, onde se localiza o gene *HMGA2*. Este codifica um fator de transcrição que promove a ativação da expressão génica através da modulação da conformação do ADN. São identificadas duas translocações neste gene - a *HMGA2-NFIB* e *HMGA2-FHIT* (Geurts *et al.*, 1997; Geurts *et al.*, 1998). Uma vez que nenhum domínio funcional comum foi encontrado entre os parceiros de translocação, o evento crítico parece ser a separação dos domínios de ligação do ADN, conduzindo a uma desregulação do oncogene *HMGA2*. A elevada expressão de *HMGA2*, resultante da sua amplificação génica, demonstra um papel relevante na transformação maligna em AP (Roijs *et al.*, 2002). Todas as alterações identificadas até ao momento, envolvendo os genes *PLAG* e *HMGA2*, são restritas ao AP, com potencialidade de serem usadas como marcador de diagnóstico. Um maior esclarecimento sobre o seu papel específico na tumorigénese deve de ser obtido em estudos complementares futuros.

Analisando os estudos citogenéticos é possível concluir que os mecanismos moleculares subjacentes à tumorigênese dos carcinomas AC são complexos e ainda não inteiramente compreendidos. No entanto, baseando-se nos resultados obtidos, é notável a importância da ativação de vias de sobrevivência celular, com concomitante supressão dos mecanismos apoptóticos para a patogênese desta neoplasia. As perdas e ampliações alélicas encontradas são díspares, não existindo ainda evidência científica suficiente que permita confirmar a existência de uma alteração recorrente neste carcinoma. No entanto, existem oncogenes com significado para o processo tumorigênico, e que podem ser divididos em 3 grupos: proteínas de desenvolvimento, fatores de crescimento e moléculas de sinalização. No primeiro grupo destaca-se a proteína c-Kit, com capacidade de ligação a células estaminais, promovendo o seu crescimento e diferenciação. A sua expressão relaciona-se com o grau de diferenciação tumoral, sendo essencial na progressão e metastização (Frost *et al.*, 2002; Freier *et al.*, 2005<sup>1</sup>; Vila *et al.*, 2009). Contudo, a expressão de c-Kit não é exclusiva desta neoplasia, perdendo figuração como específico do carcinoma AC. A proteína Myb, envolvida na regulação do ciclo celular, está igualmente incorporada neste grupo. A sua translocação com a NFIB, que induz a sua sobreexpressão, é restrita ao carcinoma AC, solidificando a função oncogénica neste tumor (West *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2013). Merecem ainda relevância no segundo grupo, os fatores de crescimento epiteliais (EGF), vasculares (VGF) e nervosos (NGF) que induzem a proliferação de células estaminais cancerígenas, aumentando a densidade vascular. No terceiro grupo, a modificação dos genes supressores tumorais relacionados com as vias de sinalização WNT e NF- $\kappa$ B impede a sua correta regularização, instigando a contínua transcrição dos seus genes-alvo (nomeadamente genes anti-apoptóticos e reguladores do ciclo celular), contribuindo para a iniciação do carcinoma AC. Por fim, a mutação no gene codificante da proteína p53, frequentemente encontrado em diversas neoplasias humanas, é relevante no AC, pela sua possível relação com um comportamento mais agressivo, sendo a sua identificação útil no prognóstico doença.

Igualmente, no carcinoma ME existem fatores genéticos particulares, específicos deste tumor, que mostram relevância no processo tumorigênico, nomeadamente a translocação que resulta no oncogene CRTC1-MAML2 (Tonon *et al.*, 2003; Enlund *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2004). O papel exato do transcrito deste oncogene ainda não é totalmente claro. Porém, é conhecido a função das proteínas originadas isoladamente por cada integrante desta translocação. O gene CRTC1 origina a proteína CREB, conhecida

por induzir a proliferação celular, encontrando-se presente nos estádios iniciais da embriogénese das GS. Por outro lado, o gene MAML codifica co-ativadores da via Notch, também esta imprescindível para a diferenciação celular (Mayr & Montemiró, 2001; Martins *et al.*, 2004). Apesar desta função fisiológica, volta a existir uma expressão ectópica nos estádios iniciais da tumorigénese do carcinoma ME, concluindo-se que as suas mutações definem a iniciação desta neoplasia. Esta modificação genética mostra ainda uma relação com o comportamento tumoral do carcinoma ME – pacientes positivos para a translocação apresentam menor recorrência e melhor taxa de sobrevivência a longo prazo (Behboubi *et al.*, 2006; Okabe *et al.*, 2006; Tirado *et al.*, 2007), demonstrando assim a importância do carácter prognóstico deste marcador.

No TW, a implicação de fatores genéticos na iniciação desta neoplasia permanece como um tópico de discussão, com necessidade de esclarecimento científico futuro. Os estudos mais recentes reportam que este não é uma verdadeira neoplasia, já que as alterações genéticas encontradas são mínimas (Honda *et al.*, 2000; Arida *et al.*, 2005).

É ainda de assinalar a importância das isoformas da proteína p63, na distinção entre tumores benignos e malignos das GS. Enquanto a isoforma TAp63 induz a apoptose, relacionando-se com o carácter indolente dos TGS, a isoforma  $\Delta$ Np63 inibe esse processo, contribuindo para a transformação maligna e carácter mais agressivo das neoplasias salivares (Yang *et al.*, 1998; Dohn *et al.*, 2001; Mitani *et al.*, 2011). A identificação de qual a isoforma presente será útil no diagnóstico diferencial e prognóstico nos TGS.

Deste modo é possível concluir que os fatores genéticos são essenciais quer na iniciação, quer na progressão tumoral e transformação maligna dos TGS. É hoje possível identificar alterações genéticas, particulares a cada neoplasia salivar. Esta distinção merece ser alvo de uma investigação aprofundada, sob o objetivo de uma melhor identificação dos fatores etiológicos nos TGS, a fim de uma futura prevenção da tumorigénese salivar.

## **6. Conclusões**

Parece existir nos últimos anos um aumento da incidência de TGS. Fatores etiológicos como a radiação e hábitos tabágicos/etanólicos, mostram possuir uma possível correlação com o risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias salivares, com necessidade de confirmação em estudos futuros.



Duas teorias propõem explicar a origem celular dos TGS: a teoria multicelular, em que duas ou mais células estaminais originam diferentes componentes, dentro do mesmo tumor; a teoria bicelular, em que uma única célula totipotente, também designada de célula estaminal cancerígena, origina as diferentes células neoplásicas, que posteriormente sofrem diferenciação, sendo esta atualmente aceita como correta.

A carcinogénese é um complexo processo dinâmico, com múltiplas etapas. É a exposição cumulativa a modificações genéticas não corrigidas que leva ao surgimento de oncogenes, responsáveis pela iniciação do processo tumoral, conjugados com a inibição de vias apoptóticas, através da perda de função de genes supressores tumorais.

A determinação da existência de modificações específicas nos TGS, e quais essas alterações, constituiu o objetivo primário desta revisão. É possível concluir que, apesar de algumas modificações genéticas comuns entre as diferentes neoplasias salivares abordadas ao longo deste trabalho, existem alterações alélicas particulares, que permitem uma distinção entre estas, constituindo uma possível justificação para a sua complexidade e diferenças histológicas, ainda que possuam uma origem num tecido idêntico. A existência de anomalias genéticas específicas sustenta a evidência de que a tumorigénese salivar não é aleatória, sendo estas essenciais à iniciação/progressão tumoral. A deteção precoce destes marcadores poderá revelar-se útil para uma intervenção mais exata e eficaz, pelo correto diagnóstico de qual o tumor em causa e qual o seu prognóstico, evitando-se deste modo procedimentos mais agressivos e com maiores taxas de morbilidade/mortalidade.

Apesar dos últimos avanços científicos na área genética das neoplasias salivares, há ainda um longo caminho a percorrer, até se obter uma clara perceção de como estes fatores desencadeiam o processo tumoral, e como poderíamos talvez prevenir a sua iniciação.

## Referência Bibliográfica

- Actis AB, Eynard AR. Influence of environmental and nutritional factors on salivary gland tumorigenesis with a special reference to dietary lipids. *Eur J Clin Nutr.* 2000 Nov;54(11):805-10.
- Adams A, Warner K, Nör JE. Salivary gland cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2013 Sep;49(9):845-53
- Alison MR, Murphy G, Leedham S. Stem cells and cancer: a deadly mix. *Cell Tissue Res.* 2008 Jan;331(1):109-24.
- Araújo VC, Martins MT, Leite KRM, Araújo NS. Immunohistochemical Mdm2 expression in minor salivary gland tumours and its relationship to p53 status. *Oral Oncol* 2000; 36:67–9.
- Arida M, Barnes EL, Hunt JL. Molecular assessment of allelic loss in Warthin tumors. *Mod Pathol.* 2005 Jul;18(7):964-8
- Asp J, Persson F, Kost-Alimova M, Stenman G. CHCHD7-PLAG1 and TCEA1-PLAG1 gene fusions resulting from cryptic, intrachromosomal 8q rearrangements in pleomorphic salivary gland adenomas. *Genes Chromosom Cancer.* 2006. 45:820–828
- Aström AK, Voz ML, Kas K *et al.* Conserved mechanism of PLAG1 activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene. *Cancer Res.* 1999; 59; 918–923
- Atula T, Grénman R, Klemi P, Syrjänen S. Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 8 and human cytomegalovirus involvement in salivary gland tumours. *Oral Oncol.* 1998 Sep;34(5):391-5.
- Barrera JE, Shroyer KR, Said S, Hoernig G, Melrose R, Freedman PD, Wright TA, Greer RO. Estrogen and progesterone receptor and p53 gene expression in adenoid cystic cancer. *Head Neck Pathol.* 2008 Mar;2(1):13-8.
- Behboudi A, Enlund F, Winnes M, Andren Y, Nordkvist A, Leivo I, *et al.* Molecular classification of mucoepidermoid carcinomas prognostic significance of the MECT1-MAML2 fusion oncogene. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45(5):470–81
- Boukheris H, Rochelle EC, Land CE, Dores GM. Incidence of carcinoma of the major salivary glands according to the World Health Organization (WHO)

- Classification, 1992–2006: a population-based study in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 November; 18(11): 2899–2906.
- Boukheris H, Ron E, Dores GM, Stovall M, Smith SA, Curtis RE. Risk of radiation-related salivary gland carcinomas among survivors of Hodgkin lymphoma: a population-based analysis. *Cancer.* 2008 Dec 1;113(11):3153-9.
  - Burkert J, Wright NA, Alison MR. Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J Pathol.* 2006 Jul;209(3):287-97.
  - Cheuk W, Chan JKC. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology.* 2007; 51:1-20
  - Clevers H, Nusse R. WNT/ $\beta$ -catenin Signaling and Disease. *Cell.* 2012 Jun; 149(6),1192-1205.
  - Coxon A, Rozenblum E, Park YS, Joshi N, Tsurutani J, Dennis PA, et al. Mect1-Maml2 fusion oncogene linked to the aberrant activation of cyclic AMP/CREB regulated genes. *Cancer Res* 2005;65(16):7137–44.
  - Daa T, Kashima K, Kaku N, Suzuki M, Yokoyama S. Mutations in components of the WNT signaling pathway in adenoid cystic carcinoma. *Modern Pathology* 2004 Jun;17, 1475-1482.
  - Debiec-Rychter M, Van Valckenborgh I, Van den Broeck C, *et al.* Histologic localization of PLAG1 (Pleomorphic Adenoma Gene 1) in pleomorphic adenoma of the salivary gland: cytogenetic evidence of common origin of phenotypically diverse cells. *Lab Invest* 2001;81:1289–1297.
  - Dohn M, Zhang S, Chen X. p63a and DNp63a can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* 2001;20:3193-205.
  - Dori S, Trougouboff P, David R, Buchner A. Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptors in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Oral Oncol.* 2000 Sep;36(5):450-3.
  - Edwards PC, Bhuiya T, Kelsch RD. C-kit expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and monomorphic adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 May;95(5):586-93.
  - Edwards PC, Bhuiya T, Kelsch RD. Assessment of p63 expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade

adenocarcinoma, and basal cell and canalicular adenomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 May;97(5):613-9.

- Enlund F, Behboudi A, Andren Y, Oberg C, Lendahl U, Mark J, *et al.* Altered Notch signaling resulting from expression of a WAMTP1-MAML2 gene fusion in mucoepidermoid carcinomas and benign Warthin's tumors. *Exp Cell Res* 2004;292(1):21–8.
- El-Rifai W, Rutherford S, Knuutila S, Frierson HF Jr, Moskaluk CA. Novel DNA copy number losses in chromosome 12q12-q13 in adenoid cystic carcinoma-Neoplasia. 2001 May-Jun; 3 (3):173-8
- Fan CY, Melhem MF, Hosal AS, Grandis JR, Barnes EL (2001). Expression of androgen receptor, epidermal growth factor receptor, and transforming growth factor alpha in salivary duct carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127: 1075-1079.
- Fan CY, Wang J, Barnes EL (2000). Expression of androgen receptor and prostatic specific markers in salivary duct carcinoma: an immunohistochemical analysis of 13 cases and review of the literature. *Am J Surg Pathol* 24: 579-586.
- Fehr A, Röser K, Belge G, Löning T, Bullerdiek J. A closer look at Warthin tumors and the t(11;19). *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2008 Oct (180): 135-139.
- Foschini MP, Gaiba A, Cocchi R, Pennesi MG, Pession A. p63 expression in salivary gland tumors: role of DeltaNp73L in neoplastic transformation. *Int J Surg Pathol.* 2005 Oct;13(4):329-35.
- Freedman LS, Oberman B, Sadetzki S. Using Time-dependent Covariate Analysis to Elucidate the Relation of Smoking History to Warthin's Tumor Risk. *Am J Epidemiol* 2009;170:1178–1185
- Freier K, Flechtenmacher C, Walch A, Ohl S, Devens F, Burke B, Hassfeld S, Lichter P, Joos S, Hofele C. Copy number gains on 22q13 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland revealed by comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 May;159(1):89-95
- <sup>1</sup> Freier K, Flechtenmacher C, Walch A, Ohl S, Devens F, Burke B, Hassfeld S, Lichter P, Joos S, Hofele C. Differential KIT expression in histological subtypes of adenoid cystic carcinoma (ACC) of the salivary gland. *Oral Oncol.* 2005 Oct; 41(9):934-9.

- Frierson HF Jr1, El-Naggar AK, Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Cheng J, Saku T, Moskaluk CA, Hampton GM. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol.* 2002 Oct;161(4):1315-23.
- Frost MJ, Ferrao PT, Hughes TP, Ashman LK. Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol Cancer Ther.* 2002 Oct;1(12):1115-24.
- Fukuda M, Fukuda F, Horiuchi Y, Oku Y, Suzuki S, Kusama K, Sakashita H. Expression of CLYD, NF-kB and NK-kB-related factors in Salivary Gland Tumors. 2006. *In Vivo* 20: 467-472.
- Fukuda M, Hiroi M, Suzuki S, Ohmori Y, Sakashita H. Loss of CLYD might be associated with development of salivary gland tumors. 2008. *Oncology Reports* 19:1421-1427.
- Geurts JM, Schoenmakers EF, Roijer E, Astrom AK, Stenman G, van de Ven WJ. Identification of NFIB as recurrent translocation partner gene of HMGIC in pleomorphic adenomas. *Oncogene* 1998; 16; 865–872.
- Geurts JM, Schoenmakers EF, Roijer E, Stenman G, Van de Ven WJ. Expression of reciprocal hybrid transcripts of HMGIC and FHIT in a pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Cancer Res.* 1997; 57; 13–17
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007;1(5):555–67.
- Glisson B, Colevas AD, Haddad R, et al. HER2 expression in salivary gland carcinomas: dependence on histological subtype. *Clin Cancer Res* 2004;10:944–946.
- Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* 1994 Mar;10(3):94-100.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica.* Saunders Elsevier. 11<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro. 2006.
- Ho AS, Kannan K, Roy DM, Morris LG, Ganly I, Katabi N, Ramaswami D, Walsh LA, Eng S, Huse JT, Zhang J, Dolgalev I et al. The Mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. *Nat Genet.* 2013 Jul;45(7):791-8

- Hollins C. Basic Guide to Anatomy and Physiology for Dental Care Professional. Wiley & Sons. 1th edition. UK. 2012
- Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q, Bartsch H, Wang ZQ, Hainaut P. New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. *Mutat Res* 1999;431:199–209.
- Honda K, Kashima K, Daa T, Yokoyama S, Nakayama I. Clonal analysis of the epithelial component of Warthin's tumor. *Hum Pathol.* 2000 Nov;31(11):1377-80.
- Horn-Ross PL, Ljung BM, Morrow M. Environmental Factors and the Risk of Salivary Gland Cancer. *Epidemiology.* 1997 Jul;8(4):414-9.
- Horsman DE, Berean K, Durham JS. Translocation (11;19)(q21;p13 1) in mucoepidermoid carcinoma of salivary gland. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;80(2):165–6.
- Hu K, Li SL, Gan YH, Wang CY, Yu GY. Epiregulin promotes migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma cell line SACC-83 through activation of ERK and Akt. *Oral Oncol* 2009;45:156–16
- Ito FA, Ito K, Coletta RD, Vargas PA, Lopes MA. Immunohistochemical study of androgen, estrogen and progesterone recetors in salivary gland tumors. *Braz Oral Res.* 2009 Oct-Dec;23(4):393-8.
- Ito FA, Ito K, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2005; 34: 533–536
- Jaskoll T, Htet K, Abichaker G, Kaye FJ, Melnick M. CRTC1 expression during normal and abnormal salivary gland development supports a precursor cell origin for mucoepidemoid cancer. *Gene Expr Patterns.* 2011. 57-63
- Jeannon JP, Soames JV, Bell H, Wilson JA. Immunohistochemical detection of oestrogen and progesterone recetors in salivary tumours. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1999 Feb;24(1):52-4.
- Jen KY, Cheng J, Li J, Wu L, Li Y, Yu S, Lin H, Chen Z, Gurtsevitch V, Saku T. Mutational events in LMP1 gene of Epstein-Barr virus in salivary gland lymphoepithelial carcinomas. *Int J Cancer.* 2003 Jul 10;105(5):654-60.

- Jeng YM, Lin CY, Hsu HC. Expression of the c-kit protein is associated with certain subtypes of salivary gland carcinoma. *Cancer Lett.* 2000 Jun 1;154(1):107-11.
- Jin C, Martins C, Jin Y, *et al.* Characterization of chromosome aberrations in salivary gland tumors by fluorescence in situ hybridization (FISH), including multicolor COBRA-FISH. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;30:161–167.
- Jones AV, Craig GT, Speight PM, Franklin CD. The Range and Demographics of Salivary Gland Tumours diagnosed in a UK Population. *Oral Oncology.* 2008; 44, 407– 417
- Johns MMI, Westra WH, Califano JA, Eisele D, Koch WM, Sidransky D. Allelotype of salivary gland tumors. 1996. *Cancer Res* 56: 1151-1154.
- Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* Guanabara Koogan, 10<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro. 2004.
- Karja VJ, Syrjanen KJ, Kurvinen AK, Syrjanen SM. Expression and mutations of p53 in salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med* 1997;26:217–223
- Kas K, Voz ML, Röijer E, *et al.* Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and b-catenin in pleomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nature Genet* 1997;15:170–174.
- Kaye, F.J., 2006. Emerging biology of malignant salivary gland tumors offers new insights into the classification and treatment of mucoepidermoid cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 3878–3881
- Kiyoshima T, Shima K, Kobayashi I, *et al.* Expression of p53 tumor suppressor gene in adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Oral Oncol* 2001;37:315–322.
- Klusmann JP, Müller A, Wagner M, Guntinas-Lichius O, Jungehuelsing M, Sloots T, Ablashi DV, Krueger GR. Human herpesvirus type 8 in salivary gland tumors. *J Clin Virol.* 2000 May;16(3):239-46.
- Klusmann PJ, Wittekindt C, Florian Preuss S, Al Attab A, Schroeder U, Guntinas-Lichius O. High risk for bilateral Warthin tumor in heavy smokers--review of 185 cases. *Acta Otolaryngol.* 2006 Dec;126(11):1213-7.
- Komiya T, Park Y, Modi S, Coxon AB, Oh H, Kaye FJ. Sustained expression of Mect1-Maml2 is essential for tumor cell growth in salivary gland cancers carrying the t(11;19) translocation. *Oncogene* 2005;25(45):6128–32.

- Kowalski PJ, Paulino AF. Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma: its causation/promotion by brain-derived neurotrophic factor. *Hum Pathol* 2002;33:933–936.
- Laane CJ, Murr AH, Mhatre NA, Jones KD, Lalwani AK. Role of Epstein-Barr virus and Cytomegalovirus in the etiology of benign parotid tumors. *Head Neck*. 2002 May;24(5):443-50.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoanq T, Caceres-Cortes J, *et al*. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCIDmice. *Nature* 1994;367(6464):645–8.
- Lee PS, Sabbath-Solitare M, Redondo TC, Ongcapin EH. Molecular evidence that the stromal and epithelial cells in pleomorphic adenomas of salivary gland arise from the same origin: clonal analysis using human androgen receptor gene (HUMARA) assay. *Hum Pathol*. 2000 Apr;31(4):498-503.
- Lewis PD, Baxter P, Griffiths AP, Parry JM, Skibinski DOF, Detection of damage to the mitochondrial genome in the oncocytic cells of Warthin's tumour. *J Pathol*. 2000 Feb; 191:274-281.
- Liang LZ, Ma B, Liang YJ, Liu HC, Zheng TH, *et al*. High expression of the autophagy gene Beclin-1 is associated with favorable prognosis for salivary gland adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2012;41(8):621-9.
- Lima Mde D, Marques YM, Alves Sde M Jr, Freitas VM, Soares FA, de Araújo VC, Pinto Ddos S Jr, Mantesso A. MDM2, P53, P21, WAF1 and pAKT protein levels in genesis and behavior of adenoid cystic carcinoma. *Cancer Epidemiol*. 2009 Aug;33(2):142-6.
- Martinelli M, Martini F, Rinaldi E, Caramanico L, Magri E, Grandi E, Carinci F, Pastore A, Tognon M. Simian Virus 40 Sequences and Expression of the Viral Large T Antigen Oncoprotein in Human Pleomorphic Adenomas of Parotid Glands. *Am J Pathol*. 2002 Oct;161(4):1127-33
- Martins C, Fonseca I, Roque L, Pinto AE, Soares J (1996). Malignant salivary gland neoplasms: a cytogenetic study of 19 cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32B: 128-132.
- Martins C, Fonseca I, Roque L, Soares J. Cytogenetic Characterisation of Warthin's Tumour. *Oral Oncol*. 1997 Sep;33(5):344-7.



- Martins C, Cavaco B, Tonon G, Kaye FJ, Soares J, Fonseca I. A study of MECT1-MAML2 in mucoepidermoid carcinoma and Warthin's tumor of salivary glands. *J Mol Diagn* 2004;6(3):205–10.
- Martins C, Fonseca I, Roque L, Pereira T, Ribeiro C, Bullerdiel J, Soares J. PLAG1 gene alterations in salivary gland pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a combined study using chromosome banding, *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *Mod Pathol*. 2005 Aug;18(8):1048-55.
- Manor E, Joshua BZ, Brennan PA, Bodner L. Chromosomal Aberrations in minor salivary gland pleomorphic adenoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012. 70:2798-2801.
- Mantesso A, Loducca SV, Bendit I, Garicochea B, Nunes FD, Araújo VC. Mdm2 mRNA expression in salivary gland tumour cell lines. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:96–101.
- Maruya SI, Kies MS, Williams M, Myers J, Weber R, Batsakis JG, El-Naggar AK. Differential expression of p63 isotypes ( $\Delta N$  and TA) in salivary gland neoplasms: biological and diagnostic implications. *Human Pathology*. 2005 May; 36:821-827.
- Matsuyama A, Hisaoka M, Nagao Y, Hashimoto H. Aberrant PLAG1 expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland: a molecular genetics and immunohistochemical study. *Virchows Arch*. 2011 Mar; 458:583-592.
- Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(8):599–609
- Melnick M, Deluca KA, Sedghizadeh PP, Jaskoll T. Cytomegalovirus-induced salivary gland pathology: AREG, FGF8, TNF- $\alpha$ , and IL-6 signal dysregulation and neoplasia. *Exp Mol Pathol*. 2013 Apr;94(2):386-97
- Melnick M, Sedghizadeh PP, Allen CM, Jaskoll T. Human cytomegalovirus and mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: Cell-specific localization of active viral and oncogenic signaling proteins is confirmatory of a causal relationship. *Exp Mol Pathol*. 2012 Feb;92(1):118-25.
- Modan B, Chetrit A, Alfandary E, Tamir A, Lusky A, Wolf M, Shpilberg O. Increased risk of salivary gland tumors after low-dose irradiation. *Laryngoscope*. 1998 Jul;108(7):1095-7.

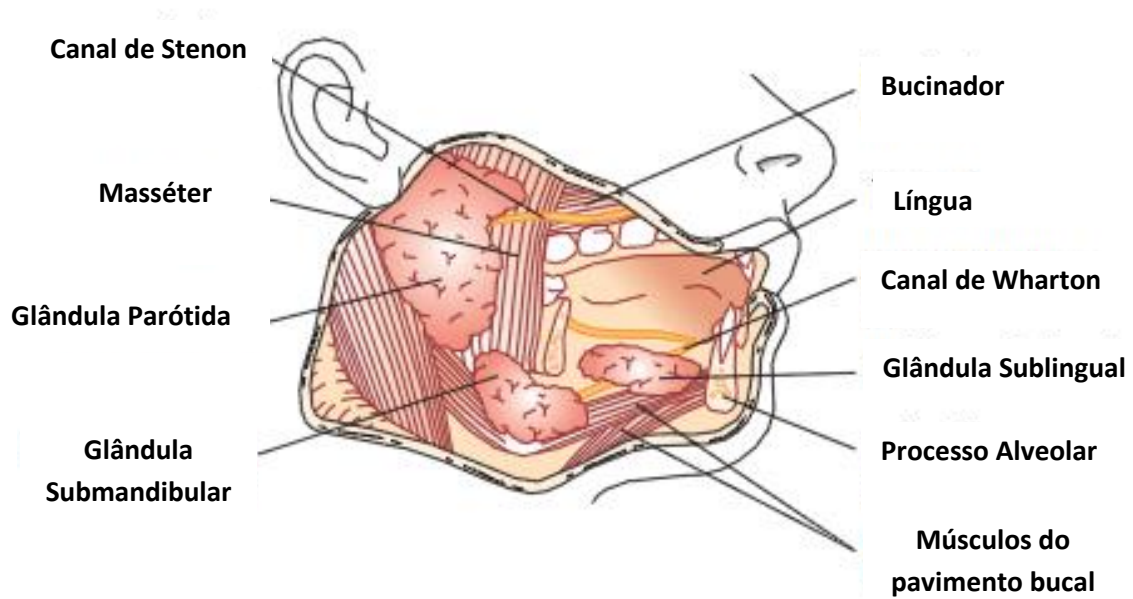
- Monteiro LS, Bento MJ, Antunes L, Lopes C. Fatores de prognóstico em neoplasias malignas de glândulas salivares. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac.* 2012;5 3(4):199–205
- Monteiro LS, Bento MJ, Palmeira C, Lopes C. Epidermal growth factor receptor immunoexpression evaluation in malignant salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med* 2009;38:508–513.
- Moore KL, Torchia MG, Persaud TVN. *The Developing Human Clinically Oriented Embryology.* Elsevier. 8th edition. London. 2012
- Nasser SM, Faquin WC, Dayal Y. Expression of androgen, estrogen, and progesterone receptors in salivary gland tumors. Frequent expression of androgen receptor in a subset of malignant salivary gland tumors. *Am J Clin Pathol.* 2003 Jun;119(6):801-6.
- Nakayama T, Miyabe S, Okabe M, Sakuma H, Ijichi K, Hasegawa Y, Nagatsuka H, Shimoizato K, Inagaki H. Clinicopathological significance of CRTC2-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinoma. *Modern Pathology.* 2009. 22, 1576-1581
- Nordkvist A, Mark J, Gustafsson H, Bang G, Stenman G. Non-random chromosome rearrangements in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. 1994. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 115-121.
- Nordkvist A, Gustafsson H, Juberg-Ode M, Stenman G. Recurrent rearrangements of 11q14–22 in mucoepidermoid carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;74(2):77–83.
- O'Neill ID. t(11;19) translocation and CRTC1-MAML2 fusion oncogene in mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol.* 2009 Jan;45(1):2-9.
- Okabe M, Miyabe S, Nagatsuka H, Terada A, Hanai N, Yokoi M, *et al.* MECT1-MAML2 fusion transcript defines a favorable subset of mucoepidermoid carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(13):3902–7.
- Ozono S, Onozuka M, Sato K, Ito Y. Immunohistochemical localization of estradiol, progesterone, and progesterone receptor in human salivary glands and salivary adenoid cystic carcinomas. *Cell Struct Funct.* 1992 Jun;17(3):169-75.
- Papadaki H, Finkelstein SD, Kounelis S, Bakker A, Swalsky PA, Kapadia SB. The role of p53 mutation and protein expression in primary and recurrent adenoid cystic carcinoma. *Hum Pathol* 1996;27:567–572.

- Persson F, Winnes M, Andrén Y, Wedell B, Asp J, Mark J, Enlund F, Stenman G. High-resolution array CGH analysis of salivary gland tumors reveals fusion and amplification of the FGFR1 and PLAG1 genes in ring chromosomes. *Oncogene*. 2008 May 8;27(21):3072-80.
- Persson F, Andrén Y, Winnes M, Wedell B, Nordkvist A, Gudnadottir G, Dahlenfors R, Sjögren H, Mark J, Stenman G (2009) High-resolution genomic profiling of adenomas and carcinomas of the salivary glands reveals amplification, rearrangement, and fusion of HMGA2. *Genes Chromosom Cancer* 48:69–82
- Roijer E, Nordkvist A, Strom AK, Ryd W, Behrendt M, Bullerdiek J, Mark J, Stenman G. Translocation, deletion/ amplification, and expression of HMGIC and MDM2 in a carcinoma ex pleomorphic adenoma. 2002 *Am J Pathol* 160: 433-440.
- Rutherford S, Yu Y, Rumpel CA, Frierson HF Jr, Moskaluk CA. Chromosome 6 deletion and candidate tumor suppressor genes in adenoid cystic carcinoma. *Cancer Lett*. 2006 May 18;236(2):309-17.
- Sadetzki S, Oberman B, Mandelzweig L, Chetrit A, Ben-Tal T, Jarus-Hakak A, Duvdevani S, Cardis E, Wolf M. Smoking and risk of parotid gland tumors: a nationwide case-control study. *Cancer*. 2008 May 1;112(9):1974-82.
- Saku T, Hayashi Y, Takahara O, Matsuura H, Tokunaga M, Tokunaga M, Tokuoka S, Soda M, Mabuchi K, Land CE. Salivary gland tumors among atomic bomb survivors, 1950-1987. *Cancer*. 1997 Apr 15;79(8):14 65-75
- Sinha N, Mukhopadhyay S, Das DN, Panda PK, Bhutia SK. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. *Oral Oncol*. 2013 Sep;49(9):854-62.
- Shao C, Bai W, Junn JC, Uemura M, Hennessey PT, Zaboli D, Sidransky D, Califano JA, Ha PK. Evaluation of MYB promoter methylation in salivary adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol*. 2011 Apr;47(4):251-5.
- Shintani S, Funayama T, Yoshihama Y, et al. Expression of c-erbB family gene products in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: an immunohistochemical study. *Anticancer Res* 1995;15:2623–2626
- Sun EC, Curtis R, Melbye M, Goedert JJ. Salivary gland cancer in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999 Dec;8(12):1095-100.

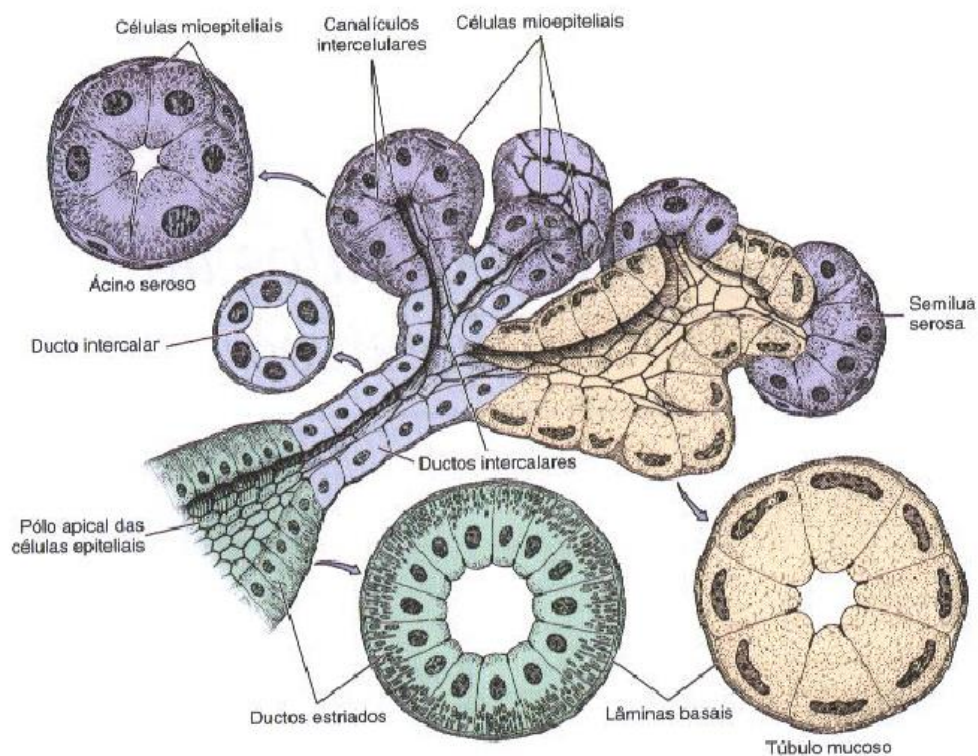
- Sun S, Wang Z. ALDH high adenoid cystic carcinoma cells display cancer stem cell properties and are responsible for mediating metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;396(4):843–8.
- Swanson GM, Burns PB (1997). Cancers of the salivary gland: workplace risks among women and men. *Ann Epidemiol* 7: 369-374.
- Takai Y, Dardick I, Mackay A, Burford-Mason A, Mori M. Diagnostic criteria for neoplastic myoepithelial cells in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas. Immunocytochemical detection of muscle-specific actin, cytokeratin 14, vimentin, and glial fibrillary acidic protein. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995 Mar;79(3):330-41.
- Tang Y, Liang X, Zheng M, et al. Expression of c-kit and Slug correlates with invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol* 2010;46:311–316.
- Thompson L, Chang B, Barsky SH. Monoclonal origins of malignant mixed tumors (carcinosarcomas). Evidence for a divergent histogenesis. *Am J Surg Pathol.* 1996 Mar;20(3):277-85.
- Tian, Z, Li L, Wang L, Hu Y, Li J. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. *Int.J.Oral Maxillofac. Surg.* 2010; 39: 235–24 2
- Tirado Y, Williams MD, Hanna EY, Kaye FJ, Batsakis JG, El- Naggar AK. CRTC1/MAML2 fusion transcript in high grade mucoepidermoid carcinomas of salivary and thyroid glands and Warthin’s tumors: implications for histogenesis and biologic behavior. *Genes Chromosomes Cancer* 2007;46(7): 708–15.
- Tonon G, Modi S, Wu L, Kubo A, Coxon AB, Komiya T, *et al.* t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet* 2003;33(2):208–13
- Vered M, Braunstein E, Buchner A. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Head Neck* 2002;24:632–636.
- Vila L, Liu H, Al-Quran SZ, Coco DP, Dong HJ, Liu C. Identification of c-kit gene mutations in primary adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Mod Pathol.* 2009 Oct;22(10):1296-302

- Vories AA, Ramirez SG. Warthin's tumor and cigarette smoking. *South Med J*. 1997 Apr;90(4):416-8.
- Voz ML, Astrom AK, Kas K, Mark J, Stenman G, Van de Ven WJ. The recurrent translocation t(5;8)(p13;q12) in pleomorphic adenomas results in upregulation of Zhou JH, Hanna EY, Roberts D, Weber RS, Bell D. ALDH1 immunohistochemical expression and its significance in salivary adenoid cystic carcinoma. *Head Neck* 2013;35(4):575–8.
- Wang L, Sun M, Jiang Y, et al. Nerve growth factor and tyrosine kinase A in human salivary adenoid cystic carcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64: 636–641.
- Weber A, Langhanki L, Schütz A, Gerstner A, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A. Expression profiles of p53, p63 and p73 in benign salivary gland tumors. *Virchows Arch*. 2002 Nov;441(5):428-36.
- West RB, Kong C, Clarke N, Gilks T, Lipsick JS, Cao H, Kwok S, Montgomery KD, Varma S, Le QT. MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol*. 2011 Jan;35(1):92-9.
- Wu L, Liu J, Gao P, Nakamura M, Cao Y, Shen H, Griffin JD. Transforming activity of MECT1-MAML2 fusion oncoprotein is mediated by constitutive CREB activation. *EMBO J*. 2005 Jul 6;24(13):2391-402
- Yamamoto Y, Virmani AK, Wistuba II, et al. Loss of heterozygosity and microsatellite alterations in p53 and RB genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Hum Pathol* 1996;27:1204–1210.
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998;2:305 - 16.
- Zhang J, Peng B. NF-kappaB promotes iNOS and VEGF expression in salivary gland adenoid cystic carcinoma cells and enhances endothelial cell motility in vitro. *Cell Prolif* 2009; 42:150–161

## Anexo 1



**Figura 1.** Localizaçaõ anômica das glândulas salivares (*in Hollins, 2012*)



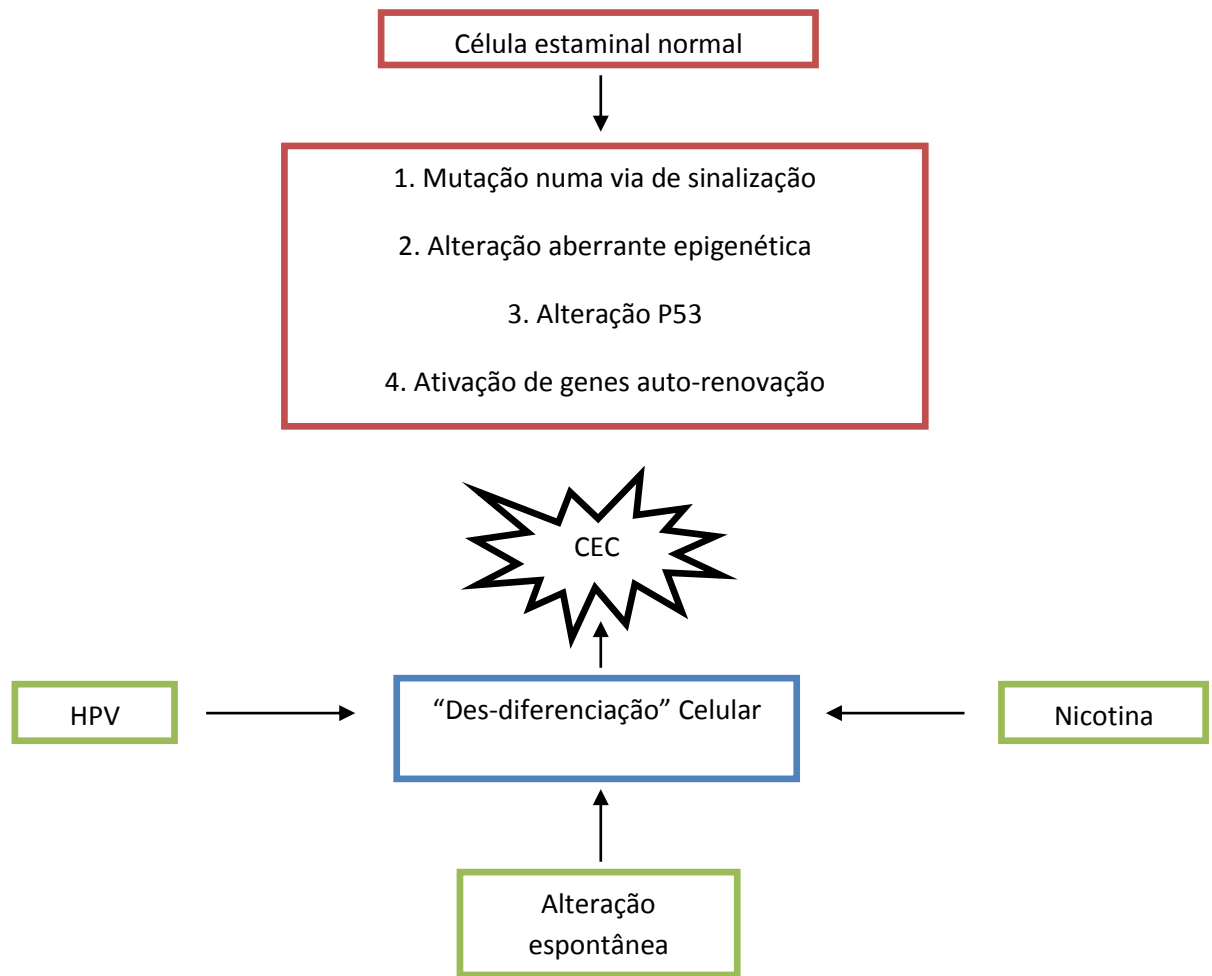
**Figura 2.** Estrutura histolôgica da Glândula Salivar (*in Junqueira & Carneiro 2004*)

## Anexo 2

<b><u>Tumores Epiteliais Malignos</u></b>	<b>ICD-O</b>	<b><u>Tumores Epiteliais Benignos</u></b>	
Carcinoma de células acinares	8550/3	Adenoma Pleiomórfico	8940/0
Carcinoma Mucoepidermóide	8430/3	Mioepitelioma	8982/0
Carcinoma Adenóide Cístico	8200/3	Adenoma de células basais	8147/0
Adenocarcinoma Polimórfico	8525/3	Tumor de Warthin	8561/0
Carcinoma mioepitelial	8562/3	Oncocitoma	8290/0
Carcinoma de células claras	8310/3	Adenoma canicular	8149/0
Carcinoma Sebáceo	8410/3	Adenoma sebáceo	8410/0
Linfoadenocarcinoma Sebáceo	8410/3	Linfoadenoma	8410/0
Adenocarcinoma de células basais	8147/3	Papiloma do ducto	8503/0
Cistadenocarcinoma	8440/3	Cistoadenoma	8440/0
Cistadenocarcinoma cribiforme		<b><u>Tumores dos tecidos moles</u></b>	
Adenocarcinoma mucoso	8480/3	Hemangiona	9120/0
Carcinoma Oncócítico	8290/3	<b><u>Tumores Hemotolinfóides</u></b>	
Carcinoma dos ductos salivares	8500/3	Linfoma de Hodgkin	
Adenocarcinoma não específico	8140/3	Linfoma de células B	9680/3
Carcinoma mioepitelial	8982/3	Linfoma de células B extranodal marginal	9699/3
Carcinoma ex adenoma pleiomórfico	8941/3	<b><u>Tumores Secundários</u></b>	
	8980/3		
Carcinosarcoma			
Carcinoma linfoepitelial	8082/3		
Adenoma pleiomórfico metastizante	8940/1		
Carcinoma de células escamosas	8070/3		
Carcinoma de células pequenas	8041/3		
Carcinoma de células gigantes	8012/3		
Sialoblastoma	8974/1		

**Figura 1.** Classificação histológica dos Tumores das Glândulas Salivares pela OMS

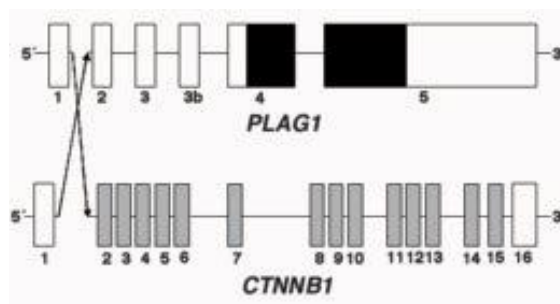
### Anexo 3



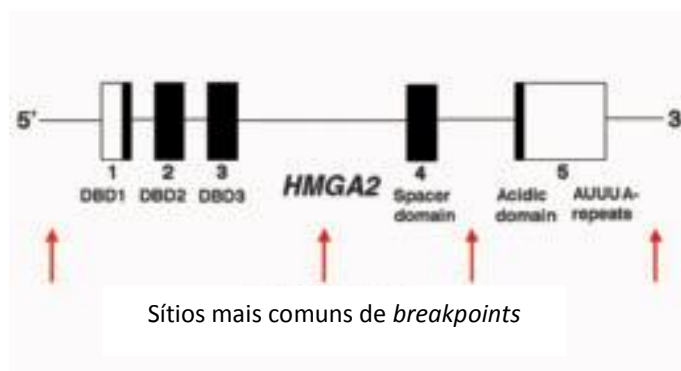
**Figura.1** Vias de formação de células estaminais cancerígenas (Adaptado de Alison *et al.*, 2008; Burkert *et al.*, 2006)



## Anexo 4

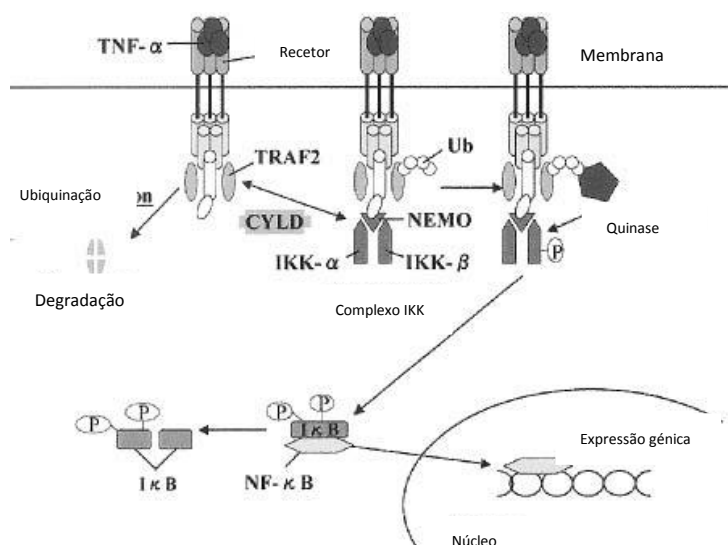


**Figura.1** - Ilustração esquemática da t(5;8), entre os genes PLAG1 e CTNNB1, no Adenoma pleiomórfico.

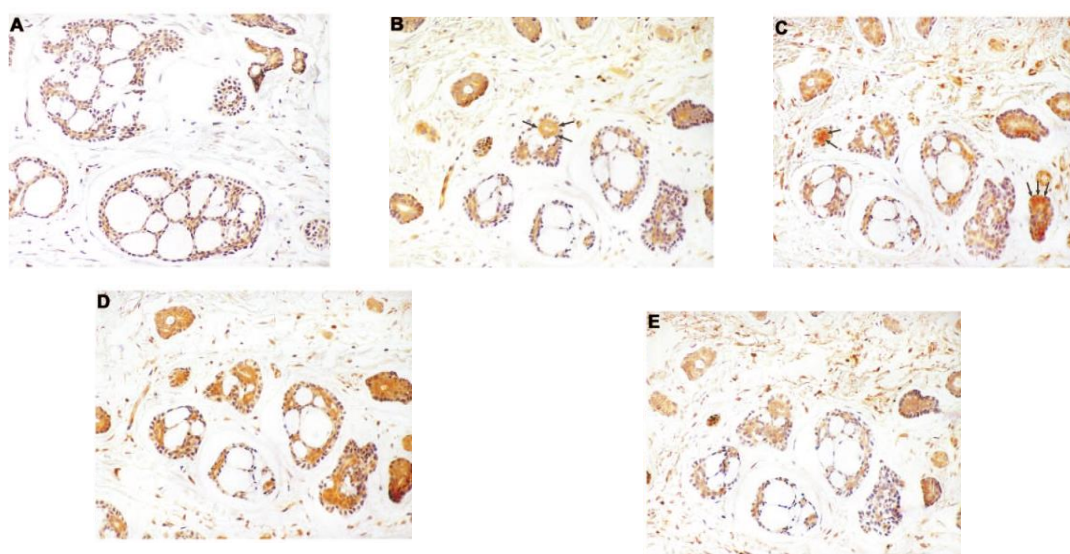


**Figura.2-** Ilustração esquemática do gene HMGA2. As setas indicam os *breakpoints* mais comuns. Os exões estão representados pelos retângulos a negro.

## Anexo 5

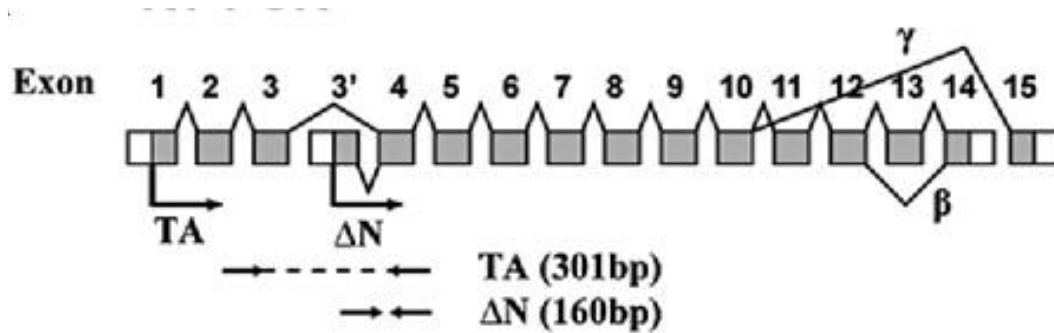


**Fig.1** – Representação esquemática da via de autoregulação pelo fator TNF-CLYD, levando à inibição da sinalização da via NF-κB (Adaptado de Fukuda *et al.*, 2006).

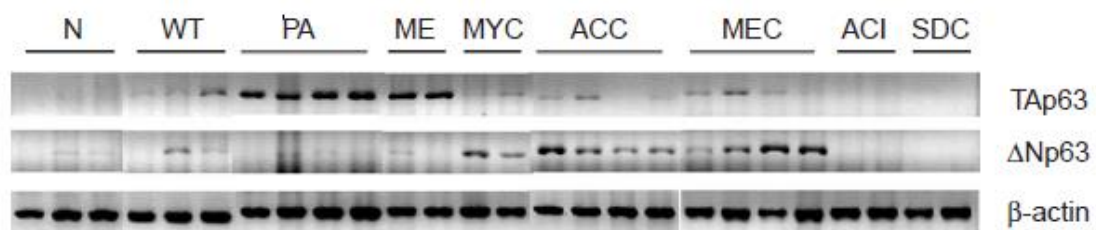


**Fig.2** - Imunoatividade para o CYLD, NF-κB e os fatores relacionados com o NF-κB foi notada esporadicamente e/ou de forma agregada nas estruturas cribiformes e do ducto, em carcinomas AC. Uma reação positiva fraca para CYLD foi observada na membrana das células cancerígenas (A). Uma reação positiva(+) para o NF-κB foi observada no citoplasma das células cancerígenas (B). Uma reação (+) leve de NF-κB foi também detetada no núcleo das células cancerígenas (indicado por setas). Uma reação (+) para IκB-α foi observada no núcleo (indicado pelas setas) e no citoplasma das células de cancro (C). Uma reação (+) forte para IKKα foi observada no citoplasma das células cancerígena (D). Uma reação (+) fraca de IKK, foi observada no citoplasma das células cancerígenas (E) (In Fukuda *et al.*, 2006).

## Anexo 6



**Figura 1** – A representação esquemática do gene TP63 (*In Mitani et al.*, 2011)



**Figura 2** – Expressão das proteínas TAp63, ΔNp63 e β- actina em tecidos salivares saudáveis (N), tumor de Warthin (WT), adenoma pleomórfico (PA), tumor mioepitelial (ME), carcinoma adenoide cístico (ACC), carcinoma Mucoepidermóide (MEC), carcinoma de células acinares (ACI) e no carcinoma do ducto salivar (SDC). É possível observar a expressão predominante de TAp63 nos tumores benignos, e por outro lado a predominante expressão de ΔNp63 nos tumores malignos (*In Maruya et al.*, 2005).